

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Buněčné biologie



Diplomová práce

Transfekce kmenových a jiných testikulárních buněk

Xenopus tropicalis

Transfection of stem cells and other testicular cells of

Xenopus tropicalis

Bc. Monika Šídová

Praha 2009

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tereza Tlapáková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Terezy Tlapákové, Ph.D., v Laboratoři vývojové biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za použití uvedené literatury.

V Praze, září 2009

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu, trpělivost, cenné rady a zkušenosti, které se mi snažila předat po celou dobu vypracovávání této diplomové práce. Dále bych poděkovala všem, jmenovitě RNDr. Jaroslavu Máchovi, Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, Ph.D., Janě Dvořákové a Markétě Kohoutové, za jejich rady a odbornou pomoc. Děkuji všem členům kolektivu naší laboratoře za příjemné pracovní prostředí a přátelskou atmosféru.

Děkuji rodičům a blízkým za velmi cennou podporu a trpělivost.

ABSTRAKT

Xenopus tropicalis je jedním z nejvýznamnějších modelových organismů, který je využíván, jak ve vývojové biologii, tak i v buněčné biologii. V laboratoři vývojové biologie, Přf UK se podařilo úspěšně založit dlouhodobou primární kulturu juvenilních buněk varlat *X. tropicalis*. Na základě genové exprese příslušných markerů (Sox9, WT1 atd.) bylo dokázáno, že převládajícím buněčným typem kultury jsou pre-Sertoliho buňky, které umožňují dlouhodobou kultivaci kolonií zárodečných kmenových buněk. Kmenovost těchto buněk byla prokázána přítomností alkalické fosfatázy v koloniích. Cílem této diplomové práce byla optimalizace práce se smíšenou buněčnou kulturou a to zejména stanovení podmínek disociace kolonií zárodečných kmenových buněk, jejich separace od podpůrné vyživovací vrstvy pre-Sertoliho buněk a na závěr určení vhodných podmínek transfekce buněk *X. tropicalis*. Zvládnutí všech uvedených technik nabízí možnost zkoumat nejen úplnou funkci zárodečných kmenových buněk a jejich diferenciaci, ale i možný nástroj pro inaktivaci různých genů a další experimenty spojené s transgenezí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Xenopus, pre-Sertoliho buňky, zárodečné kmenové buňky, dezintegrace, transfekce, fluorescenční průtoková cytometrie, transmisní elektronová mikroskopie, transgeneze

ABSTRACT

Xenopus tropicalis represents one of the most important model organism used in developmental and cellular biology. Laboratory of Developmental Biology at the Faculty of Science, Charles University in Prague has successfully established a long-term culture of *X. tropicalis* juvenile testicular cells. Based on expression profiling analysis of selected specific markers (Sox9, WT1, *etc*) it was proven that the major cell type in this culture is pre-Sertoli cells. Furthermore these pre-Sertoli cells allow a long-term cultivation of the germinal stem cells. By performing a histochemical test for the presence of alkaline phosphatase in the colony of these cells were proven the features of stem cells. In this diploma thesis we focused on optimization of work with the mixed cell culture. In particular we define conditions of dissociation and subsequent separation of a feeder-layer formed by the pre-Sertoli cells. We also attempted to develop suitable conditions for transfection of the germinal cells. With these techniques we will to investigate the functional properties of the germinal stem cells. Moreover, it provides us a powerful tool for performing another experiments focused on transgenesis and/or different gene inactivation.

KEYWORDS

Xenopus, pre-Sertoli cells, germinal stem cells, desintegration, transfection, fluorescence-activated cell sorting, transmission electron microscopy, transgenesis

OBSAH

Seznam zkratk	4
1 Úvod	6
2 Cíle diplomové práce	8
3 Literární přehled	9
3.1 <i>Xenopus</i> jako modelový organismus	9
3.1.1 Systematické zařazení a zeměpisný původ	12
3.1.2 <i>Xenopus laevis</i>	13
3.1.3 <i>Xenopus tropicalis</i>	14
3.1.4 Porovnání <i>X. laevis</i> a <i>X. tropicalis</i>	16
3.1.5 Chov žab rodu <i>Xenopus</i>	17
3.2 Zárodečné kmenové buňky	18
3.2.1 Determinace primordiálních zárodečných buněk.....	18
3.2.1.1 Determinace PGCs u rodu <i>Xenopus</i>	19
3.2.1.1.1 Lokalizace a složky zárodečné plasmy.....	19
3.2.1.1.2 Pohyb zárodečné plasmy po oplození oocyту	20
3.2.1.1.3 Segregace zárodečné plasmy	20
3.2.1.1.4 Migrace presumptivních primordiálních zárodečných buněk ..	21
3.2.2 Vývoj varlat.....	23
3.2.3 Interakce mezi zárodečnými buňkami a Sertoliho buňkami	26
3.2.4 Využití zárodečných kmenových buněk	27
3.2.4.1 Přenos zárodečných kmenových buněk.....	28
3.2.4.2 Možnosti transformace PGCs	29
4 Materiál a metody	30
4.1 Materiál	30
4.1.1 Živý materiál	30
4.1.1.1 Žáby	30
4.1.1.2 Buněčné kultury.....	30
4.1.1.2.1 <i>X. tropicalis</i>	30
4.1.1.2.2 <i>X. laevis</i>	30
4.1.1.3 Bakterie.....	30
4.1.2 Materiál užívaný při práci s buněčnou kulturou	31
4.1.2.1 Kultivační médium	31
4.1.2.2 Přípravné transfekční médium.....	31
4.1.2.3 Transfekční médium	32
4.1.2.4 Dezintegrační látky.....	32
4.1.2.5 Transfekční reagentie	32
4.1.3 Restrikční endonukleázy	33
4.1.4 Barvicí látky	33
4.1.5 Antibiotika	34
4.1.6 Roztoky	34
4.1.7 Ostatní materiál	34
4.1.8 Přístroje	35

4.2	Metody	36
4.2.1	Kultivace buněčné kultury <i>in vitro</i>	36
4.2.1.1	Podmínky kultivace buněčné kultury	36
4.2.1.2	Uchovávání buněčných kultur	36
4.2.1.3	Testování zárodečných kmenových buněk	37
4.2.2	TK ⁻ linie pre-Sertoliho buněk	37
4.2.2.1	Příprava TK ⁻ linie pre-Sertoliho buněk	38
4.2.3	Vizualizace struktury kolonií na elektronovém mikroskopu	39
4.2.3.1	Příprava preparátu pro transmisní elektronovou mikroskopii	39
4.2.4	Disociace kolonií zárodečných kmenových buněk	41
4.2.4.1	Mechanická disociace	41
4.2.4.2	Chemická disociace	41
4.2.4.2.1	Trypsin-EDTA	42
4.2.4.2.2	Accutase TM	42
4.2.4.2.3	Cystein	43
4.2.4.2.4	Dithiotreitol (DTT)	43
4.2.4.2.5	Jodistan draselný (KIO ₄)	43
4.2.4.2.6	Biotase	43
4.2.4.2.7	Papain	44
4.2.5	FACS	44
4.2.5.1	Příprava vzorků pro FACS	45
4.2.5.1.1	Zárodečné kmenové buňky z kultury	45
4.2.5.1.2	Zárodečné kmenové buňky <i>X. laevis</i>	45
4.2.6	Transfekce buněk	46
4.2.6.1	Typy transfekovaných buněk	46
4.2.6.2	Plasmidy	46
4.2.6.2.1	pPNT	46
4.2.6.2.2	pEGFP-N3	47
4.2.6.2.3	Amplifikace a izolace plasmidu	48
4.2.6.2.4	Kontrola plasmidů	49
4.2.6.3	Elektroporace	49
4.2.6.4	Lipofekce	49
4.2.6.4.1	Lipofektamin TM 2000, TransFektin TM	50
4.2.6.4.2	FuGene [®] HD Transfection Reagent, TurboFect TM	50
4.2.6.4.3	jetPEI TM (Polymer-based DNA transfection reagent)	50
4.2.6.5	Selekce transfekovaných buněk	51
4.2.6.6	Analýza a zpracování obrazu	51
5	Výsledky	52
5.1	TK⁻ linie pre-Sertoliho buněk	52
5.2	Vizualizace struktury kolonií pomocí TEM	53
5.3	Disociace kolonií zárodečných kmenových buněk	54
5.3.1	Mechanická disociace	54
5.3.2	Chemická disociace	55
5.3.2.1	Accutase TM	56

5.3.2.2	Biotase	57
5.3.2.3	Papain.....	57
5.4	FACS	59
5.5	Transfekce buněk.....	60
5.5.1	Elektroporace	60
5.5.2	Lipofekce.....	61
5.5.2.1	Lipofekce pre-Sertoliho buněk	61
5.5.2.2	Transfekce embryonální linie <i>X. laevis</i>	63
5.5.2.3	Transfekce zárodečných kmenových buněk <i>X. tropicalis</i>	64
6	Diskuse	65
7	Závěr.....	71
8	Seznam literatury	72
9	Přílohy	80

SEZNAM ZKRATEK

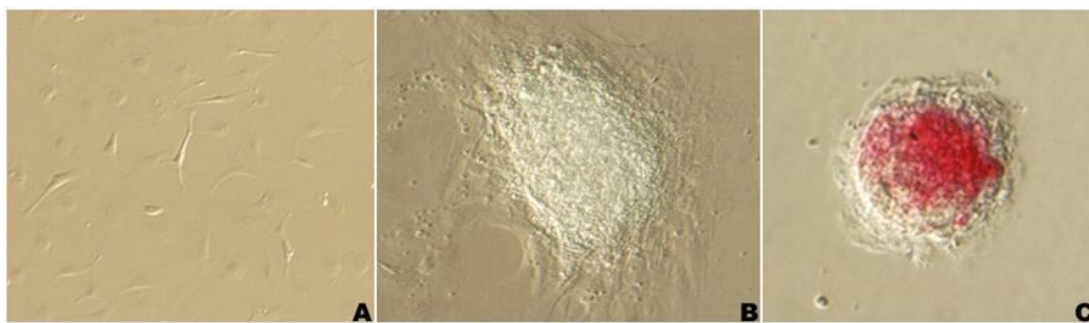
AMH	anti - Müllerian hormone
aMOs	antisense morpholino oligonucleotides
BFM	bromfenolová modř
BMP	bone morphogenetic protein
bp	base pair
BrdU5	5-bromo-2-deoxyuridin
BTB	blood-testis barrier
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dazl	deleted in Azoospermia-like
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiotreitol
dpc	days post coitum
ECCs	embryonic carcinoma cells
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGCs	embryonic germ cells
EGF	epidermal growth factor
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
ESCs	embryonic stem cells
EST	expressed sequence tag
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization
GFP	green fluorescent protein
GNDF	glial cell line-derived neurotrophic factor
HAT	hypoxantin aminopterin tymidin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

hCG	human chorionic gonadotropin
HGPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
KGF	keratinocyte growth factor
LIF	leukemia inhibitory factor
MDH	malate dehydrogenase
METRO	message transport organizer
mRNA	messenger ribonucleic acid
NIH	National Institutes of Health
PBS	phosphate buffered saline
PGCs	primordial germ cells
pPGCs	presumptive primordial germ cells
REMI	restriction enzyme mediated integration
RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT	room temperature
SCF	stem cell factor
Sox9	SRY-related HMG box
SRY	sex-determining region on the Y chromosome
SWCs	surface contraction waves
TBE	Tris-borate-EDTA pufr
TEM	transmission electron microscopy
TGF- β	transforming growth factor- β
TK-	thymidin kinase deficient
TNAP	tissue nonspecific alkaline phosphatase
TSA	tyramide signal amplification
UTR	untranslated region
WT1	Wilms' tumor suppressor gene 1
Xldazl	<i>Xenopus laevis</i> DAZ-like gene
Xklp1	<i>Xenopus</i> kinesine-like protein
Xlsirt	<i>Xenopus laevis</i> short interspersed repeat transcript

1 ÚVOD

Obojživelníci patří mezi klíčové modelové organismy vývojové biologie. Je to dáno vnějším oplozením, vývojem značného počtu embryí a evoluční blízkostí se savci. V současné době je největší zájem soustředěn na žáby rodu *Xenopus*, resp. na jediný diploidní druh, *Xenopus tropicalis*. Intenzivní studium jeho genomu značně přispívá k řešení problémů spojených s diferenciací buňky a vývojovými procesy.

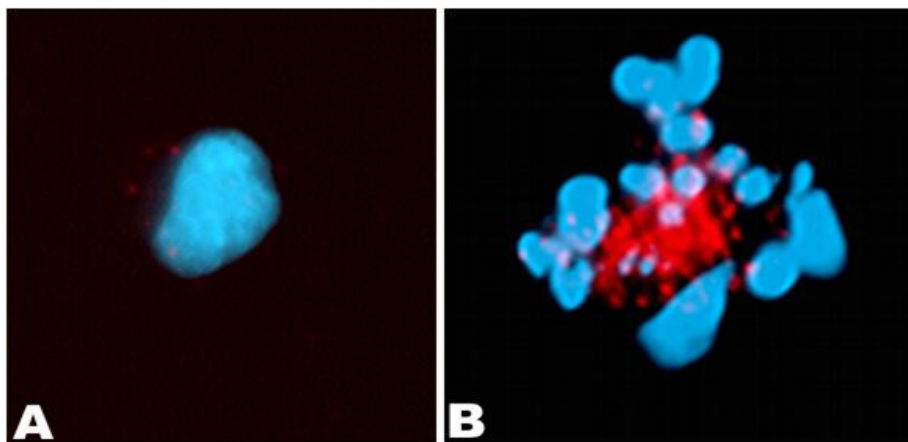
Laboratoř vývojové biologie, Katedra buněčné biologie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, se podílí na mapování genomu *Xenopus tropicalis*. Lokalizace genů se původně prováděla na chromozomálních preparátech z buněk sleziny usmrčených zvířat. Z důvodu velké spotřeby pokusných zvířat byla snaha získat trvalou buněčnou kulturu *X. tropicalis*. Po několika pokusech se naší laboratoři podařilo úspěšně založit dlouhodobou primární kulturu odvozenou od juvenilních buněk varlat *X. tropicalis*. Na základě genové exprese příslušných markerů (Sox9, WT1 atd.) bylo dokázáno, že převládajícím buněčným typem kultury jsou pre-Sertoliho buňky. Při kultivaci buněk v kondicionovaném médiu byl prokázán výrazný pozitivní vliv tohoto média na růst a rychlost jejich proliferace. Zároveň bylo pozorováno, že po dlouhodobé kultivaci bez výměny média dochází v kultuře k výskytu kolonií zárodečných kmenových buněk. Tyto kolonie mají charakteristickou morfologii a výskyt kmenových buněk v koloniích byl potvrzen reakcí na přítomnost alkalické fosfatázy (Obr. 1). Oddělení těchto dvou buněčných typů od sebe je velmi obtížné z důvodu intenzivní chemotaxe pre-Sertoliho buněk, které migrují k zárodečným kmenovým buňkám a vytváří s nimi smíšené kolonie. Pokusy vedoucí k zastavení proliferace pre-Sertoliho buněk pomocí mitomycinu nebyly úspěšné, pravděpodobně kvůli značnému množství růstových faktorů, které pre-Sertoliho buňky produkují.



Obr. 1. Histochemický test na přítomnost alkalické fosfatázy (zvětšení 100x).

- A) Podpůrná vyživovací vrstva z pre-Sertoliho buněk.
- B) Pre-Sertoliho buňky s kolonií zárodečných kmenových buněk.
- C) Pozitivní výsledek na přítomnost alkalické fosfatázy v kolonii.

U kolonií zárodečných kmenových buněk byla také provedena lokalizace genu VASA, který se řadí mezi charakteristické markery zárodečných kmenových buněk (Obr. 2).



Obr. 2. Lokalizace VASA markeru pomocí metody FISH-TSA (jádra značená DAPI, VASA značený rhodaminem).

- A) Exprese VASA v pre-Sertoliho buňkách.
- B) Exprese VASA v kolonii zárodečných kmenových buněk na podpůrné vyživovací vrstvě z pre-Sertoliho buněk.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zásadním požadavkem při studiu zárodečných kmenových buněk je optimalizace práce s jejich kulturou. Tento fakt je rozhodující pro budoucí experimenty naší laboratoře. Nabízí možnost nejen potvrdit úplnou funkci těchto buněk a přístup k výzkumu utváření spermií, ale i příležitost pro *in vitro* transgenezi a tím i možný nový model pro inaktivaci různých genů.

Pre-Sertoliho buňky jeví v kultuře intenzivní chemotaxi, migrují k zárodečným kmenovým buňkám a vytváří spolu smíšené kolonie. Tyto kolonie zůstávají kompaktní i po působení proteolytického enzymu trypsinu, který se běžně používá při manipulaci s adherentními kulturami. Důležitým krokem je tedy oddělení těchto dvou buněčných typů od sebe a získat tak čistou, silně obohacenou kulturu zárodečných kmenových buněk. Pozitivní výsledek testu na přítomnost alkalické fosfatázy v koloniích zárodečných kmenových buněk není dostačujícím důkazem jejich kmenovosti. Tyto buňky je nutné transfekovat vybraným GFP (green fluorescent protein) plasmidem a poté transplantovat do varlat chemicky sterilizovaného samce *X. tropicalis*. Pokud transgenní buňky znovu osídlí varlata a prodělají normální spermatogenezi (Brinster and Zimmermann, 1994), bude tím prokázána kmenovost těchto buněk.

Cíle předkládané diplomové práce:

1. Disociace kolonií zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis*.
2. Separace pre-Sertoliho buněk a zárodečných kmenových buněk.
3. Optimalizace transfekce buněk kultury *X. tropicalis*.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Vývojová biologie v poslední době prodělává explozivní rozvoj. Při studiu embryonálních indukcí orgánů a diferenciací buněk můžeme sledovat tři přístupy. U *X. laevis* a *X. tropicalis* jsou to metody využívající mikroinjekce mRNA (messenger ribonucleic acid) do oocyty a následné sledování efektů v průběhu morfogeneze. V savčí embryologii se využívají tkáňové kultury obvykle pro studium terminální diferenciace, případně pro výzkum diferenciace kmenových buněk. Tento přístup je zatím možné využít pouze u myši. Třetím velmi významným přístupem je knock-out genu v kmenových buňkách a jejich následné použití k přípravě transgenních jedinců. I tato metoda je používána výhradně u myši. Nedostatečné znalosti signálů vedoucí k diferenciaci kmenových buněk brání k jejich častějšímu používání. Použití metody knock-out a udržování kmenových buněk *in vitro* u obojživelníků by významně přispělo ke studiu diferenciace orgánů a tkání.

3.1 *Xenopus* jako modelový organismus

Z pohledu embryologie jsou možné tři modelové organismy obratlovců. Prvním je myš (*Mus musculus*) s malým počtem embryí, kde je pro pozorování vývoje nutná kultivace embrya *in vitro*. Druhým modelem je zástupce ryb zebříčka, u které je nespornou výhodou vnější, dobře pozorovatelný vývoj a průhledná embrya, ale neúspěšnost mikromanipulací a mikroinjekcí do blastomer z důvodu křehkosti embryí činí tento model nevhodným (Hirsch *et al.*, 2002a). Třetím a z hlediska mikromanipulací, mikroinjekcí a regenerace nejvýhodnějším modelovým organismem obratlovců je žába rodu *Xenopus*.

Roku 1935 získal Hans Spemann Nobelovu cenu za objev organizátoru u obojživelníků. Díky této skutečnosti výrazně vzrostl vědecký zájem o obojživelníky z hlediska časného embryonálního vývoje a experimentální embryologie (Callery, 2006). Z počátku evropští embryologové používali zejména embrya čolků (např. *Triturus*) a embrya žáby *Rana temporaria*, příbuzné severoamerickému druhu *Rana pipiens*. První pokusy s žabími oocyty zahrnovali transplantace jader do enukleovaných oocytů (King and Briggs, 1955). Důkaz, že oocyty žab rodu *Xenopus* dokáží translatovat injikovanou exogenní mRNA, byl dalším klíčovým experimentem, který postrčil rod *Xenopus* do popředí zájmu (Gurdon *et al.*, 1971). O čtyři roky později se oocyty začaly používat pro *in vivo* studium funkce biologických makromolekul (Gurdon, 1975). Žáby rodu *Xenopus* se tak postupně staly jedním z nejzásadnějších modelových systémů.

Dnes jsou žáby rodu *Xenopus* nepostradatelnou složkou, jak při studiu časného embryonálního vývoje obratlovců, tak i v buněčné biologii. Výhody tohoto modelového organismu jsou dány hned několika faktory zahrnující dostatečnou velikost oocytů a embryí, indukovatelnou ovulaci, vnější oplození a již od první rýhy dobře pozorovatelnou embryogenezi (Beck and Slack, 2001). Poté, co zárodek stráví značnou část žloutkových granúl, se ve stádiu pulce stává transparentním, což umožňuje při studiu vývojových procesů (knock-out, gene trap, promotor trap apod.) využívat fluorescenční reportérové geny jako např. GFP. Velikost oocytů i embryí dovoluje mikrochirurgické manipulace včetně mikroinjekcí. Navíc embrya žab rodu *Xenopus* vykazují po použití těchto technik neobvykle vysokou schopnost regenerace.

Při studiu funkcí genů během časného embryonálního vývoje se využívá injikace antisens-RNA (ribonucleic acid) nebo antisens morpholino oligonukleotidů (aMOs) do cytoplasmy vajíčka. Oba přístupy jsou určené k blokaci exprese zkoumaných genů a na základě výsledného fenotypu je identifikována jejich funkce. Tyto oligonukleotidy mohou být dvou typů.

aMOs, která jsou komplementární k iniciačnímu místu translace mRNA, specificky a účinně blokují translaci, jak u embryí *X. tropicalis* (Nutt *et al.*, 2001), tak i u embryí *X. laevis* (Heasman *et al.*, 2000; Heasman, 2002). Druhý typ aMOs brání dozrání mRNA, a tak i následné translaci přes komplementaritu k sestřihovému místu v pre-mRNA. Z důvodu detailnější znalosti sekvence genomu *X. tropicalis* je druhý typ aMOs převážně používán právě u tohoto druhu (Kenwrick *et al.*, 2004; Rana *et al.*, 2006). Nespornou nevýhodou těchto metod je pouze přechodný efekt injikovaných látek. Nedochází ke změně genomu a krátký poločas rozpadu injikované mRNA, antisens RNA či antisens morpholino oligonukleotidů neumožňuje jejich využití v pozdějších vývojových stádiích.

Kroll and Amaya (1996) přišli s průlomovou transgenní metodou REMI (restriction enzyme mediated integration), která je založená na společné inkubaci exogenní DNA (deoxyribonucleic acid) s restriční endonukleázou a permeabilizovanými spermii s dekonzenzovaným chromatinem. Mikroinjikací takto upravených spermiových jader do oocytů *Xenopus laevis* dochází k vývoji embryí, které stabilně exprimují vložený gen. Další výzkum poukázal na rozdílnost potomků F₀ generace po použití této metody, která je dána restričními enzymy způsobující integraci exogenní DNA na různých místech (Marsh-Armstrong *et al.*, 1999). REMI transgenní metoda, původně vyvinutá pro *X. laevis*, se později začala využívat i při práci s *X. tropicalis* (Offield *et al.*, 2000). Do výhod transgeneze pomocí této metody je nutné započítat vysokou účinnost a vznik nemosaikovitých zvířat (Hirsch *et al.*, 2002a). Ke zdůraznění této výhody poslouží porovnání s transgenezí na myším modelu, kde výsledkem často bývá mosaicismus. U myši je funkce genu studována pomocí mutovaných či transgenních embryonálních kmenových buněk (ESCs) injikovaných do blastocyst (Chen *et al.*, 2000). V F₀ generaci vznikají chiméry, které exprimují transgen jen v některých buňkách jedince a až v F₂ generaci vznikají recesivní homozygoti. Z výše uvedeného je patrné, že transgeneze u myši je časově náročný proces.

Podmíněná transgeneze pomocí tkáňově specifického promotoru (Cre/LoxP, GAL4/UAS, případně FLP systému) umožňuje expresi transgenu jen v určité tkáni (Werdien *et al.*, 2001; Chae *et al.*, 2002). Dosud bylo připraveno více než 20 reportérových linií *X. tropicalis* (Hirsch *et al.*, 2002b), které stabilně exprimují GFP nebo RFP (red fluorescent protein) pod tkáňově specifickým promotorem (Matz *et al.*, 1999).

3.1.1 Systematické zařazení a zeměpisný původ

Rod *Xenopus* fylogeneticky spadá do třídy *Amphibia* (Obojživelníci), podtřídy *Ecaudata* (Bezocasí), řádu *Anura* (žáby), čeledi *Pipidea*, podčeledi *Xenopodinae* a společně s rodem *Silurana* tvoří skupinu takzvaných drápatých žab (označení vychází z anglického výrazu „African Clawed Frogs“) (de Sa and Hillis, 1990; Cannatella and de Sa, 1993). Čeleď *Pipidea* zahrnuje i podčeleď *Pipinae*, do které je řazeno sedm druhů amerických *Pip* (Cannatella and Trueb, 1988). Rod *Xenopus* se dělí na dvě větve, první *Xenopus* zahrnující *X. laevis* a druhou *Silurana*, kam se řadí druh *X. tropicalis* (Evans *et al.*, 2004). K evolučnímu oddělení těchto dvou větví došlo zhruba před 30 miliony let (Bisbee *et al.*, 1977).

Zeměpisně pochází žáby rodu *Xenopus* z mokřad a bažin Jižní Afriky. Konkrétní výskyt laboratorně využívaného druhu *Xenopus laevis* (drápatka vodní) byl zaznamenán v oblasti Cape Flats kolem Kapského města v jižní Africe.

3.1.2 *Xenopus laevis*

Xenopus laevis se do centra pozornosti dostal ve 30. letech 20. století, kdy bylo zjištěno, že podáním lidského choriogonadotropinu (hCG) je možné u samic vyvolat ovulaci kdykoliv během roku (Bellerby, 1934; Shapiro and Zwarenstein, 1934). Zpočátku byl tento druh využíván na testy těhotenství, kdy injekční podání moči těhotné ženy pod kůži žáby u ní vyvolalo do 12 hodin ovulaci. Díky tomuto praktickému využití došlo v 50. letech k rozšíření *Xenopus laevis* do klinických laboratoří po celém světě (Gurdon and Hopwood, 2000).

Zvláštností rodu *Xenopus* je fakt, že až na jediný druh vykazují všechny ostatní (16-20 druhů) polyploidní původ, tvořící série 2:4:8:12 (Kobel and Du Pasquier, 1986). *X. laevis* je v důsledku duplikace genomu allotetraploid nesoucí čtyři kopie mnoha genů. Allotetraploidní druh vzniká hybridizací, při které jsou zachovány diploidní genomy obou rodičovských organismů (Thiebaud and Fischberg, 1977). K umlčení jednoho genu na úrovni mRNA jsou tudíž nutné čtyři antisens sekvence odpovídající čtyřem možným typům alel. Z tohoto důvodu není *X. laevis* vhodným modelovým organismem na genomické a genetické studie (Amaya *et al.*, 1998). Graf (1989) dokázal, že celá řada proteinů a enzymů se ale v genomu *Xenopus laevis* vyskytuje v neduplikované formě, tzn. genom tohoto druhu byl částečně diploidizován. I přes tyto obtíže bylo dosaženo některých významných výsledků, například kompletní sekvenování mitochondriálního genomu (Roe *et al.*, 1985).

Mitotický karyotyp *X. laevis* tvoří 18 chromozomů rozdělených do sedmi morfologicky odlišných skupin mediocentrických a akrocentrických chromozómů, které v meióze tvoří bivalenty (Tymowska and Fischberg, 1973; Thiebaud and Fischberg, 1977).

Určení pohlaví u *Xenopus laevis* odpovídá typu Abraxas (samčí ZZ, samičí WZ), ale i přes důkladnou morfologickou analýzu se heterochromozómy *X. laevis* zatím nepodařilo identifikovat (Schmid and Steinlein, 1991).

3.1.3 *Xenopus tropicalis*

V dnešní době je zájem soustředěn na druh *Xenopus (Silurana) tropicalis*, protože jde o jediný diploidní druh tohoto rodu ($2n = 20$) (Beck and Slack, 2001; Hirsch *et al.*, 2002a). Zároveň tento druh představuje mezi obojživelníky jeden z nejmenších genomů, velikost genomu v haploidním jádře je $1,7 \times 10^9$ bp (base pair) (Thiebaud and Fischberg, 1977). Mitotický karyotyp tvoří 10 chromozomových párů, které lze podle velikosti a polohy centromery rozdělit do šesti morfologicky odlišných skupin submetacentrických a akrocentrických chromozomů (Tymowska, 1973).

Paralelně s vývojem systému *X. tropicalis* se National Institutes of Health v USA (NIH - <http://www.nih.gov/science/models/xenopus/>) intenzivně zabýval i vývojem genetických a genomických informačních zdrojů (Klein *et al.*, 2002). Od roku 2003 bylo již zveřejněno, převážně v podobě náhodně exprimovaných sekvencí (EST), přes 670 000 sekvencí *X. laevis* a více než 1 200 000 sekvencí *X. tropicalis* z různých tkání a vývojových stádií. Při takovém množství nových informací o sekvencích je *X. tropicalis* na devátém místě v seznamu organismů s největším množstvím určených EST sekvencí (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Informace týkající se *Xenopus* EST sekvencí jsou k dispozici na internetových stránkách GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>).

V současné době probíhá vytváření genetické mapy *X. tropicalis* sestavené na základě identifikace polymorfních markerů. Potvrzením této mapy bude fyzická lokalizace vybraných polymorfních markerů do jednotlivých chromozomů pomocí metody FISH-TSA. Na tomto projektu se podílí i Laboratoř vývojové biologie, PřF UK v Praze. Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s tyramidovou amplifikací signálu (TSA) byl prvním zmapovaným genem *X. tropicalis* mitochondriální malát-dehydrogenáza (Mdh2) (Krylov *et al.*, 2007). Zároveň byla dokázána vysoká citlivost FISH-TSA metody pro lokalizaci paralogních genů, jež vykazují 95% shodu (paralogy mitochondriální malát-dehydrogenázy, Mdh2a, Mdh2b) (Tlapakova *et al.*, 2005).

Stejně jako u *X. laevis* je možné u *X. tropicalis* pomocí injekce hCG stimulovat ovulaci kdykoliv během roku. Tímto způsobem jsou eliminovány problémy spojené s nedostatkem experimentálního materiálu. Zároveň je *X. tropicalis* oproti myšimu modelu dlouho žijícím organismem, dožívá se i více než 8 let. Množství vajíček ve snůšce se pohybuje v rozmezí 1000-3000 a ačkoliv je jejich velikost oproti oocytům *X. laevis* poloviční, jsou dostatečně velká pro mikromanipulace či injekce RNA.

Xenopus tropicalis je významným modelovým organismem hlavně na poli regulace embryonálního vývoje. Často využívanou metodou je genetický screening zprostředkovaný náhodnou mutací pomocí ENU (N-ethyl N-nitrosourea). Mutovaní jedinci se zajímavým fenotypem jsou následně podrobeni detailnější analýze (Goda *et al.*, 2006).

3.1.4 Porovnání *X. laevis* a *X. tropicalis*

Druhy *X. laevis* a *X. tropicalis* se na první pohled liší velikostí těla. Dospělci *X. laevis* dorůstají do 10 cm a velikost nakladených vajíček se pohybuje kolem 1 - 1,3 mm. V porovnání je *X. tropicalis* velikostně menším druhem, dospělci jsou okolo 4 – 5 cm a vajíčka mezi 0,7 - 0,8 mm (Obr. 3, Tab. 1).



Obr. 3. Porovnání velikostí dospělých samic *Xenopus laevis* (vlevo) a *Xenopus tropicalis* (vpravo) (Hirsch *et al.*, 2002a).

Allotetraploidní původ a duplikace většiny genů *X. laevis* činí tento druh nevhodným pro genetické a genomické studie. Další nevýhodou *X. laevis* je dlouhá generační doba (1-2 roky), díky které je vytvoření stabilní transgenní linie pomalým procesem. *Xenopus tropicalis* však tyto nevýhody nemá. Vzhledem k diploidnímu genomu a generační době 4-6 měsíců je *X. tropicalis* upřednostňovaným modelem pro multigenerační genetické či genomické analýzy a transgenní přístupy (de Sa and Hillis, 1990; Amaya *et al.*, 1998). Na druhé straně pomalý embryonální vývoj *X. laevis*, velká vajíčka a embrya řadí tento druh k vhodným modelům experimentální embryologie a biologie.

Skutečnost, že oba druhy jsou si evolučně velmi příbuzné, umožňuje ve většině případů využít data z EST a cDNA (complementary DNA) knihoven *X. laevis* i při studiu *X. tropicalis* (Amaya *et al.*, 1998). Molekulární sondy určené k *in situ* hybridizaci, RNA sondy či protilátky navrhnuté na *X. laevis* lze s výhodou použít i na *X. tropicalis* (Khokha *et al.*, 2002).

	<i>X. laevis</i>	<i>X. tropicalis</i>
Ploidie	Allotetraploid	Diploid (n=10)
Velikost genomu	3,1 x 10 ⁹ bp	1,7 x 10 ⁹ bp
Velikost vajíčka	1 – 1,3 mm	0,7 – 0,8 mm
Počet vajíček / snůžka	300 – 1000	1000 – 5000
Generační doba	8 – 12 měsíců a více	3 – 5 měsíců
Velikost dospělce	10 cm	4-5 cm

Tab. 1. Porovnání základních údajů *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis* (Hirsch *et al.*, 2002a).

3.1.5 Chov žab rodu *Xenopus*

X. laevis i *X. tropicalis* jsou vodními živočichy, a tak chov i rozmnožování probíhá ve vodních nádržích. Oproti většině obojživelníků nevyžadují živou stravu (Amaya *et al.*, 1998). Při porovnání chovu mezi těmito dvěma druhy žab má nižší prostorové nároky *X. tropicalis*, avšak jeho reakce na zhoršené životní podmínky je citlivější.

3.2 Zárodečné kmenové buňky

3.2.1 Determinace primordiálních zárodečných buněk

U většiny živočichů, zejména u hmyzu a obratlovců, dochází k oddělení zárodečné linie buněk od somatické linie již v časném embryonálním vývoji. Naopak tomu je např. u ploštěnek nebo žahavců, kdy ke vzniku zárodečných buněk dochází až v dospělosti. Prekursori zárodečných buněk jsou tzv. primordiální zárodečné buňky (PGCs), které v průběhu embryogeneze migrují do genitálních rýh, tzn. do místa, kde se později založí gonády, a osídlují je.

Primordiální zárodečné buňky mohou být určeny dvěma způsoby. Autonomní způsob specifikace PGCs se vyskytuje např. u ovocné mušky (*Drosophila melanogaster*) nebo u žab, kde PGCs vznikají z buněk obsahující tzv. zárodečnou plasmu. Nejvíce prostudovaným organismem z hlediska složení zárodečné plasmy a migrace PGCs je právě *Drosophila melanogaster*. U obojživelníků byla objevena zárodečná plasma poprvé u druhu *Rana temporaria* (Bounoure, 1929 – citováno dle Ikenishi, 1998). U savců se v porovnání s rodem *Xenopus* vyskytuje zcela jiný způsob určení primordiálních zárodečných buněk. V časném embryonálním vývoji jsou PGCs determinovány indukčními signály z okolních buněk (Wakahara, 1996). Indukčním místem je posteriorní oblast epiblastu, kde dochází ke styku extraembryonálního ektodermu, epiblastu, primitivního proužku a alantoisu. Extraembryonální ektoderm se díky expresi BMP4 a BMP8b (bone morphogenetic protein) stává induktorem (Lawson *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2000). Akceptorem signálu je skupina posteriorních buněk epiblastu exprimující na svém povrchu transmembránový protein *fraggilis*. PGCs vznikají z centrální skupiny 20ti buněk, které kromě *fraggilis* navíc exprimují geny *blimp1* a *stella* (Saitou *et al.*, 2002; Bortvin *et al.*, 2004).

3.2.1.1 *Determinace PGCs u rodu Xenopus*

3.2.1.1.1 *Lokalizace a složky zárodečné plasmu*

Jak již bylo řečeno, u žab rodu *Xenopus* vznikají primordiální zárodečné buňky pouze z buněk obsahující zárodečnou plasmu. Ta se v neoplozeném oocyty vyskytuje ve formě cytoplasmatických ostrůvků v kortikální oblasti poblíž vegetálního pólu (Heasman *et al.*, 1984). Zárodečná plasma je součástí oblasti METRO (message transport organiser) mitochondriálního mraku (Balbianiho tělísko) (Kloc *et al.*, 2002) a je složena z mRNA, mitochondriálních rRNA (ribosomal ribonucleic acid) a germinálních granul. Dynamická 3D struktura germinálních granul se v průběhu embryonálního vývoje mění a tím umožňuje asociaci se specifickými regulačními RNA molekulami. Translokace heterologních RNA molekul do oblasti vegetálního kortexu, kde se nachází zárodečná plasma, je zprostředkována Xist repetitivní RNA (homolog savčího Xist, který se u samic uplatňuje při inaktivaci jednoho X chromosomu) (Kloc *et al.*, 1993). Mezi markery vegetálního kortexu se řadí mRNA Xcat-2 (Forristall *et al.*, 1995), Vg-1 (Weeks and Melton, 1987) a Xlwn-11 (Ku and Melton, 1993). mRNA Xcat-2 je lokalizovaná v mitochondriálním mraku (Zhou and King, 1996), ze kterého je pomocí 164 nukleotidů dlouhé 3' nepřekládané UTR oblasti (untranslated region) cílena do germinálních granul (Kloc *et al.*, 2000). Bylo prokázáno, že Xcat-2 patří do stejné rodiny RNA-vazebných proteinů, jako nanos *Drosophila melanogaster* a stejně tak se podílí na specifikaci germinálních buněk (Mosquera *et al.*, 1993).

3.2.1.1.2 *Pohyb zárodečné plasmy po oplození oocyty*

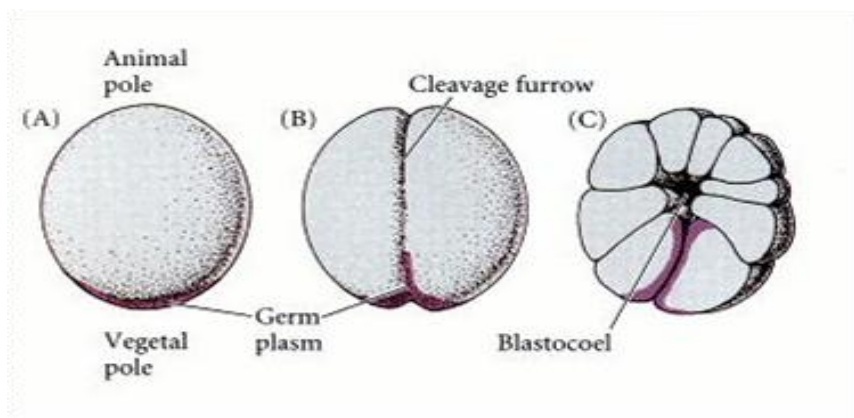
Po oplození a zahájení kortikální rotace jsou ostrůvky zárodečné plasmy připojovány k žloutkové masě a migrují na vegetální pól vajíčka, kde spolu fúzí ve větší shluky. Důležitou roli v procesu migrace zaujímá cytoskelet. Agregace zárodečné plasmy je závislá na mikrotubulech a vyžaduje Xklp1 (*Xenopus* kinesin-like protein 1) (Robb *et al.*, 1996). Xklp1 zajišťuje pohyb ve formě tzv. povrchových vln cytoplasmy SWCs (surface contraction waves), které jsou nezbytné pro správnou agregaci a distribuci ostrůvků zárodečné plasmy, nikoliv však pro samotnou kortikální rotaci (Quaas and Wylie, 2002). Následujícím krokem migrace zárodečné plasmy je přesun shluků z kortikální oblasti vegetálního pólu směrem do vajíčka. Tento pohyb nevyžaduje cytoskeletální vlákna, ale je založen na proudění cytoplasmy (Ressom and Dixon, 1988).

Celý postup migrace zárodečné plasmy lze sledovat v živém embryu pomocí fluorescenční látky barvící specificky její komponenty (DiOC₆ – 3,3'-dihexyloxacarbocyanin) (Savage and Danilchik, 1993).

3.2.1.1.3 *Segregace zárodečné plasmy*

Presumptivní primordiální zárodečné buňky (pPGCs - buňky, které ještě nedosáhly gonád) jsou charakterizovány přítomností zárodečné plasmy. Ve stádiu čtyř blastomer obsahují zárodečnou plasmu všechny čtyři buňky (Whittington and Dixon, 1975). Až třetím, ekvatoriálním dělením dochází k rozdělení rýhujícího se embrya na animální blastomery, které zárodečnou plasmu neobsahují, a vegetální blastomery, které zárodečnou plasmu obsahují. Během dalšího rýhování nedochází ke zvyšování počtu presumptivních PGCs a to z důvodu asymetrického dělení zárodečné plasmy do dceřiných buněk. Stádium časně blastuly (stádium 7) obsahuje presumptivní PGCs stále ve

vegetální oblasti, v pozdní blastule (stádium 9) jsou již tyto buňky detekovatelné mezi vegetativním pólem a blastocelom (Obr. 4) (Kamimura *et al.*, 1976) a posléze jsou lokalizované na dně blastocelu (Kloc *et al.*, 1993).



Obr. 4. Lokalizace a pohyb zárodečné plasmy (značena fialově) během rýhování (Gilbert, 2006).

- A) Zárodečná plasma je po oplození soustředěna do vegetálního pólu vajíčka.
- B) Lokalizace zárodečné plasmy ve stádiu 2 buněk.
- C) Ve stádiu pozdní blastuly se zárodečná plasma nachází v buňkách tvořící dno blastocelu.

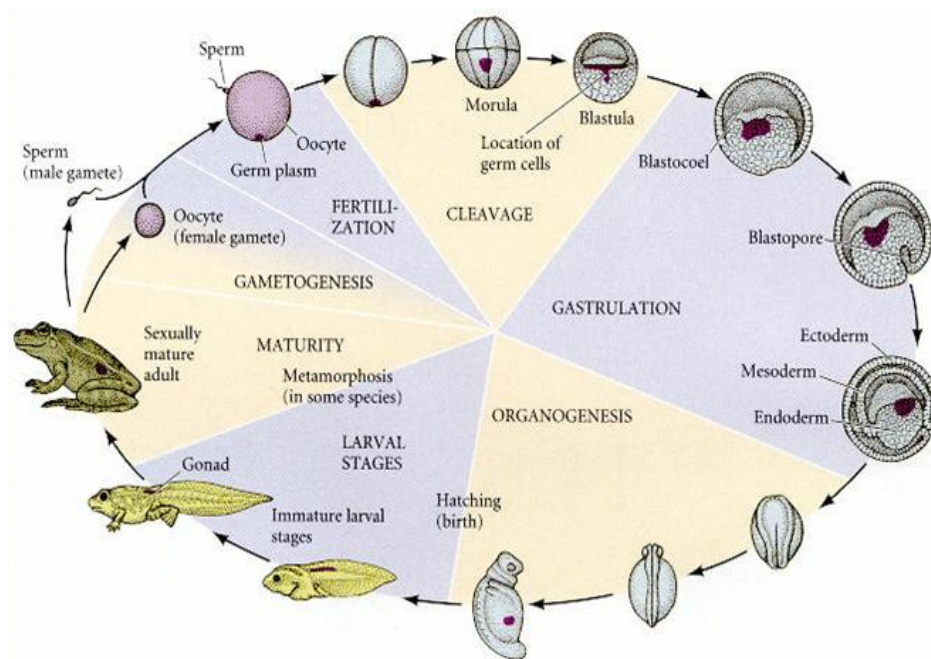
3.2.1.1.4 Migrace presumptivních primordiálních zárodečných buněk

Po skončení gastrulace jsou pPGCs pozorovány v centrální části entodermální buněčné masy, kde zůstávají až do vývojového stádia 28 (Kamimura *et al.*, 1976). Ve stádiu časného pulce (stádium 40) jsou pPGCs nahromaděny v posteriorní oblasti embryonálního střeva odkud vystupují a migrují skrz dorzální stranu mesenteria až dosáhnou genitálních rýh (stádium 46) (Obr. 5). Významnou roli během této migrace hraje extracelulární glykoprotein fibronectin, který je syntetizovaný buňkami mesenteria (Heasman *et al.*, 1981). Vlastní pohyb presumptivních PGCs je zprostředkován polymerací F-aktinu a díky tomu dochází k aktivnímu prodlužování filopodií, které se přes integriny naváží na extracelulární matrix (Nishiumi *et al.*, 2005). Tvarová rozdílnost migrujících PGCs buněk (kulaté) a endodermálních buněk (polygonální) usnadňuje studium migrace (Kamimura

et al., 1976). Ze všech těchto údajů vyplývá, že při výzkumu mechanismů migrace v podmínkách *in vitro* je nutné kultivovat pPGCs na podpůrné vyživovací vrstvě buněk mesenteria (Heasman and Wylie, 1978).

Důležitou roli při migraci pPGCs hrají i mRNA uložené v zárodečné plasmě. Delecí maternálně uložené *Xldazl* (*Xenopus laevis* DAZ-like) mRNA pomocí antisens oligonukleotidů dochází k zastavení migrace pPGCs do dorzálního entodermu. Kvůli tomu se poté neuskuteční přestup těchto buněk do dorzální strany mesenteria. Homology této RNA se vyskytují, jak u *Drosophila melanogaster* (*boule*), myši (*Dazl* - deleted in Azoospermia -like), tak i u člověka (*DAZL*). Ve všech případech se jedná o gen kódující RNA-vazebný protein, který se uplatňuje v časně diferenciaci a migraci pPGCs (Houston and King, 2000).

Zvýšení počtu presumptivních PGCs nastává až během gastrulace (Ikenishi and Kotani, 1979), kdy dochází k přemístění zárodečné plasmy do okolí buněčného jádra a následkem toho k symetrickému dělení mezi dceřiné buňky. Migrující presumptivní PGCs podstoupí třikrát mitotické dělení a do genitálních rýh vstupuje nakonec 30 buněk (Whittington and Dixon, 1975). Po vstupu do genitálních rýh nastupuje proliferace a diferenciaci PGCs na zárodečné kmenové buňky.

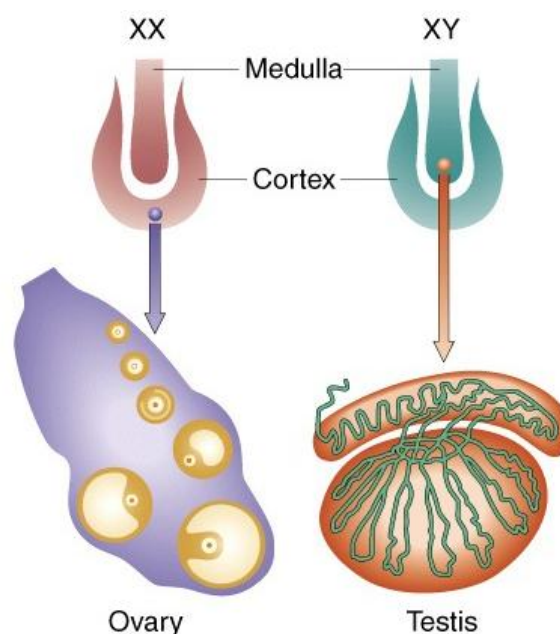


Obr. 5. Osud zárodečné plasmy (značená fialově) v životním cyklu *Amphibia* – řád *Anura* (Gilbert, 2006).

Po oplození je zárodečná plasma lokalizovaná ve vegetálním pólu oocyty a během rýhování putuje podél rýh nově vznikajících blastomer. V pozdní blastule se zárodečná plasma nachází v buňkách tvořící dno blastocelu. Při následné gastrulaci se presumptivní PGCs hromadí v posteriorní části embryonálního střeva, odkud přes dorzální mesenterium migrují do genitálních rýh. Po metamorfóze se pohlavně nedospělé larvální stádia mění v pohlavně dospělé jedince.

3.2.2 Vývoj varlat

Vzhledem k tomu, že informace o diferenciaci pohlavních orgánů u obojživelníků nejsou prozatím objasněny, se následující údaje o vývoji varlat a interakci Sertoliho buněk a zárodečných buněk týkají savčího modelu. Gonády se v počátečním vývoji zárodku formují jako párová bipotenciální žláza. Tato žláza má původ v intermediálním mesodermu a vzniká proliferací buněk epiteliální vrstvy genitálních rýh, které následně dají vzniknout somatickým komponentům pohlavních orgánů. Struktura bipotenciálních žláz je členěna na dřeň (medulla) a kůru (cortex) (Josso, 2008).



Obr. 6. Vývoj bipotenciální žlázy u myši.

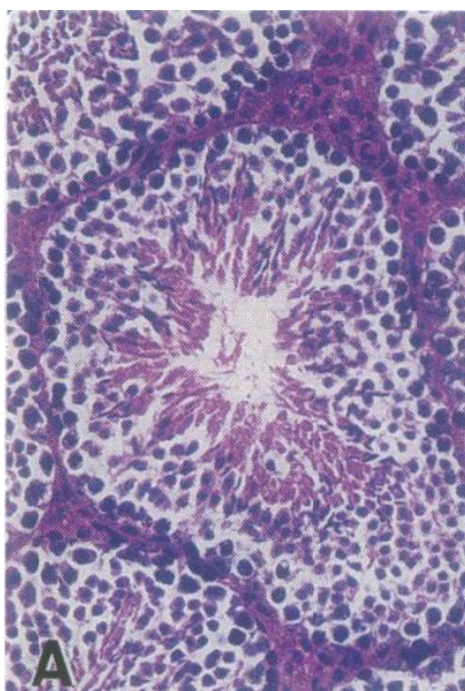
U XX (samice) dochází v rozvoji kůry bipotenciální žlázy za vzniku ovarii.

U XY (samec) dochází k rozvoji dřeně za vzniku varlat.

U samičího zárodku dochází k proliferaci buněk kůry, které posléze kolem zárodečných buněk vytvoří folikuly. U samčího zárodku dochází k proliferaci buněk dřeně (Obr. 6) a k jejich diferenciaci v pre-Sertoliho buňky, které jsou charakteristické velkým obsahem cytoplasmy, drsným endoplasmatickým retikulem a produkcí AMH (anti - Müllerian hormone), který způsobuje zablokování vývoje samičích vývodů (Müllerovy trubice) (Tran and Josso, 1982). Zároveň se u samců pod vlivem testosteronu vyvíjí Wolfova trubice, z které vznikají nadvarlata, *vas deferens* a seminální váčky. Naopak je tomu u samic, kde dochází k ústupu Wolfovy trubice a k vývoji Müllerovy trubice, která se následně diferencuje ve vejcovody, dělohu a horní část vagíny. Wolfova trubice je odvozená od laterálního mesodermu, kdežto Müllerova trubice vzniká invaginací povrchového epitelu *mesonephros* (Morrish and Sinclair, 2002).

Semenotvorné kanálky varlat se formují z vrstvy pre-Sertoliho buněk obklopující zárodečné buňky a nad nimi uloženou vrstvou peritubulárních

myoidních buněk s bazální laminou (Morrish and Sinclair, 2002) (Obr. 7). Z vnější strany semenotvorných kanálků se nacházejí Leydigovy buňky, které diferencují z intersticiálních mesenchymových buněk a produkují samčí pohlavní hormon testosteron.



Obr. 7. Příčný řez semenotvorným kanálkem varlete myši (převzato Brinster and Zimmermann, 1994).

Kolem semenotvorného kanálku je patrná extracelulární matrix s Leydigovými buňkami. Pod basální membránou jsou umístěné Sertoliho buňky spojené se zárodečnými kmenovými buňkami. Směrem do středu kanálku probíhá spermatogeneze, která končí v lumenu odchodem spermií do nadvarlat.

(barvení hematoxylin a eosin, zvětšení 140x)

Určení pohlaví je primárně závislé na genu SRY (sex – determining region of the Y chromosome), který je lokalizován na krátkém rameni Y chromosomu. Jeho 223 aminokyselin dlouhý DNA vazebný protein slouží jako transkripční faktor genů určující vývoj varlat (Sinclair *et al.*, 1990). Příkladem je transkripční faktor Sox9 (Sry-like HMG box), jehož exprese je ovlivňována SRY (Sekido *et al.*, 2004) a zároveň je brán jako marker

diferenciace Sertoliho buněk. Indukce diferenciace Sertoliho buněk je jednou z hlavních funkcí genu SRY (Schmahl *et al.*, 2000).

3.2.3 Interakce mezi zárodečnými buňkami a Sertoliho buňkami

Chování zárodečných buněk během vývoje gonád je odlišné v závislosti na pohlaví. U samic dochází k proliferaci zárodečných kmenových buněk až do 13,5 dpc (days post coitum), kdy dochází k zahájení meiózy a následnému zastavení v profázi I (McLaren and Southee, 1997). Přítomnost meiotických oocytů je nezbytná pro další vývoj ovariálních folikulů (McLaren, 1995). U samců je 12,5 dpc pozorovatelný mitotický arest a zároveň Sertoliho buňky brání předčasnému vstupu zárodečných kmenových buněk do meiotické fáze (Morrish and Sinclair, 2002). Sertoliho buňky produkují velké množství parakrinních faktorů, jejichž role je klíčová v regulaci proliferace a diferenciace zárodečných buněk, avšak jejich funkce není dosud zcela známá.

Vazba mezi zárodečnými a Sertoliho buňkami má významný vliv na průběh spermatogeneze. Přímé spojení mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami je zprostředkováno mezibuněčnými lektinovými spoji, které jsou vytvářeny N-glykosilovanými proteiny. Důkazem jsou sterilní samci, jejichž zárodečné buňky mutované v genu *Man2a2* nevytvářejí tyto spoje, tudíž neadherují k Sertoliho buňkám a jsou předčasně transportovány do nadvarlat (Akama *et al.*, 2002). Těsné spojení mezi Sertoliho buňkami na okrajích semenotvorných kanálků vytváří bariéru (BTB - blood-testis barrier) mezi krví a zárodečnými buňkami (Lui *et al.*, 2003). Tato bariéra se vytváří z pre-Sertoliho buněk, které proliferují, formují semenotvorné kanálky a dosud neprošly maturací. Během adolescence dochází k dozrání v Sertoliho buňky, zastavení proliferace a jejich funkce se soustřeďuje na správný průběh spermatogeneze (Konrad *et al.*, 2005). Po zahájení spermatogeneze dochází k asymetrickému dělení zárodečných kmenových buněk. Toto dělení vede, jak ke stálému udržování

jejich populace, tak i k vytvoření populace buněk, ze kterých vznikají zralé spermie (Sutton, 2000). Sertoliho buňky mají nutritivní úlohu ve vývoji pohlavních buněk. Syntetizují vyživovací látky, které jsou následně sekrecí nebo pomocí mezerových spojů (gap junction) dopraveny do spermatocytů. Zároveň Sertoliho buňky přetvářejí glukózu na zdroj energie, který je pro spermatocyty vhodnější (Risley, 1990).

Důležitou roli v přežívání, diferenciaci a proliferaci PGCs hrají geny pro receptorovou tyrozin kinázu (c-kit) a její ligand SCF (stem cell factor), který je produkován Sertoliho buňkami (Rossi *et al.*, 2000). Vliv těchto molekul na PGCs byl objasněn u myši mutací genů White spotting a Steel, kdy došlo ke ztrátě PGCs u obou pohlaví (Sette *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že v podmínkách *in vitro* SCF brání programované buněčné smrti či apoptóze. Stejný efekt vykazuje i LIF (leukemia inhibitory factor) (Pesce *et al.*, 1993). Sertoliho buňky sekretují mnoho dalších proteinů, například transferin a klasterin, které ovlivňují růst a vývoj PGCs (Konrad *et al.*, 2005).

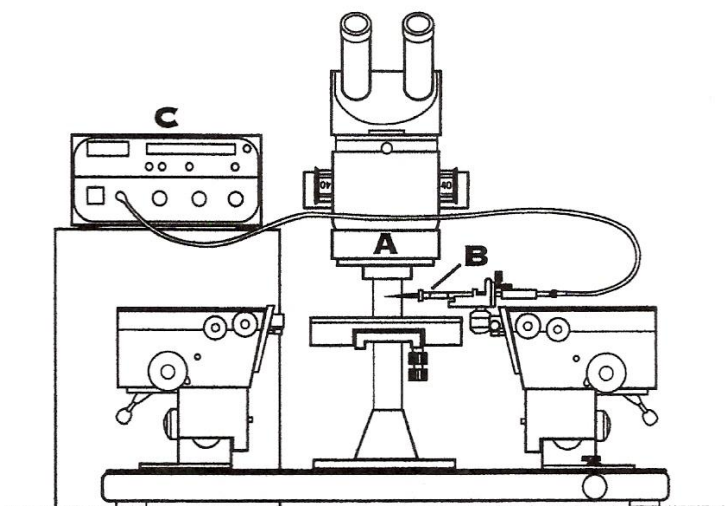
3.2.4 Využití zárodečných kmenových buněk

Nejpřístupnější zdroj kmenových buněk u obojživelníků jsou zárodečné kmenové buňky z varlat. Studium vývoje varlat se ubírá dvěma směry. Jedním z nich je sledování složitých vztahů mezi buňkami a tkání diferencujícího se orgánu a případné využití těchto poznatků v medicíně. Druhý směr studuje zárodečné kmenové buňky jako takové.

3.2.4.1 Přenos zárodečných kmenových buněk

Brinster and Zimmerman (1994) provedli studii, která se týkala transplantace zárodečných kmenových buněk izolovaných z varlat donorového samce myši. Mikroinjikace získaných buněk do semenotvorných kanálků varlat sterilního samce prokázala, že jsou tyto buňky schopné znovu osídlit varlata a prodělat morfologicky normální spermatogenesi (u myši trvající 35 dní). Recipientní samec později produkoval zdravé a plodné potomky s genetickou výbavou odpovídající donoru (Brinster and Avarbock, 1994).

Pro úspěšné založení kultury myších zárodečných kmenových buněk byla nedávno použita čerstvě narozená mláďata myši exprimující GFP (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). Kultivační médium obsahovalo krom obvyklých složek i neurotrofický faktor, epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) a LIF. Po kultivaci byly tyto buňky transplantovány do semenotvorných kanálků sterilních samců myši, kteří poté produkovali potomky exprimující GFP.



Obr. 8. Aparatura pro mikroinjekce do varlat (převzato od Brinster and Zimmermann, 1994).

A) Mikroskop s pracovním stolem. Myš v anestezii s vyoperovanými varlaty je položena na pracovním stole. Zvětšení přibližně 120x.

B) Držák na injekční mikropipetu.

C) Mikroinjektor. Mikropipeta je hadičkou spojena s mikroinjektorem, kterým lze aplikovat donorové spermatogonie do varlat sterilního samce myši.

Injekce mikropipetou je ještě kontrolována mikromanipulátorem, který je umístěn po stranách.

3.2.4.2 Možnosti transformace PGCs

Z primordiálních zárodečných buněk lze získat dva typy pluripotentních kmenových buněk (Donovan and de Miguel, 2003). *In vivo* dochází k transformaci PGCs v embryonální nádorové buňky (ECCs), které vytvářejí testikulární tumor. Ve vhodném médiu se mohou tyto kultivované buňky diferencovat do mnoha buněčných typů. Vzhledem k tomuto faktu se ECCs stávají nástrojem pro výzkum determinace a diferenciace buněk v definovaném médiu (Martin and Evans, 1975).

V podmínkách *in vitro* lze PGCs transformovat v embryonální germinální buňky (EGCs) (Donovan and de Miguel, 2003). Kultivační médium obsahující Kit ligand, LIF a FGF umožňuje stálou proliferaci v nediferenciovaném stavu, což potvrzuje exprese markerů kmenových buněk (Aflatoonian and Moore, 2005). V tomto případě se jedná o povrchové markery SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, tkáňově nespecifickou alkalickou fosfatázu (TNAP) a Oct-4 (Shamblott *et al.*, 1998). V médiu, které obsahuje vedle běžných složek pouze Kit ligand, PGCs proliferují zhruba jeden týden a poté diferencují nebo z kultury zcela vymizí (Donovan and de Miguel, 2003).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Živý materiál

4.1.1.1 Žáby

Xenopus tropicalis, inbrední kmen Ivory Coast, chov Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.

Xenopus laevis, chov Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.

4.1.1.2 Buněčné kultury

4.1.1.2.1 *X. tropicalis*

Dlouhodobě rostoucí primární kultura odvozená od juvenilních buněk varlat samce *Xenopus tropicalis*.

4.1.1.2.2 *X. laevis*

Embryonální buněčná linie *Xenopus laevis*.

4.1.1.3 Bakterie

K amplifikaci plasmidů byly použity bakterie One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (C404010, Invitrogen).

4.1.2 Materiál užívaný při práci s buněčnou kulturou

4.1.2.1 *Kultivační médium*

V závorkách je uvedeno množství jednotlivých složek média v celkovém objemu 450 ml:

• L-15 Leibovitz (L5520, Sigma)	33,3%	(150 ml)
• RPMI 1640 (82 mg/ml) HEPES mod. (Sigma)	33,3%	(30 ml)
• FBS (Fetal bovine serum) (F7524, Sigma)	6,67%	(30 ml)
• Glutamin (25 mg/ml) (Sevapharma a.s.)	0,66%	(3 ml)
• 7,5% NaHCO ₃ (Sevapharma a.s.)	0,13%	(7,8 ml)
• Gentamycin (80 mg/ml) (Veterinární Lek)	0,05%	(225 µl)
• deionizovaná H ₂ O	25,89%	(229 ml)

4.1.2.2 *Přípravné transfekční médium*

V závorkách je uvedeno množství jednotlivých složek média v celkovém objemu 30 ml:

• L-15 Leibovitz (L5520, Sigma)	33,3%	(10 ml)
• RPMI 1640 (82 mg/ml) HEPES mod. (Sigma)	33,3%	(2 ml)
• Glutamin (25 mg/ml) (Sevapharma a.s.)	0,66%	(200 µl)
• 7,5% NaHCO ₃ (Sevapharma a.s.)	0,13%	(520 µl)
• deionizovaná H ₂ O	32,61%	(17,28 ml)

4.1.2.3 *Transfekční médium*

V závorkách je uvedeno množství jednotlivých složek média v celkovém objemu 150 ml:

• L-15 Leibovitz (L5520, Sigma)	33,3%	(50 ml)
• RPMI 1640 (82 mg/ml) HEPES mod. (Sigma)	33,3%	(10 ml)
• FBS (F7524, Sigma)	6,67%	(10 ml)
• Glutamin (25 mg/ml) (Sevapharma a.s.)	0,66%	(1 ml)
• 7,5% NaHCO ₃ (Sevapharma a.s.)	0,13%	(2,6 ml)
• deionizovaná H ₂ O	25,94%	(76,4 ml)

4.1.2.4 *Dezintegrační látky*

- Trypsin-EDTA solution 10x (T4174, Sigma)
- Trypsin-EDTA Mixture 1x (25300-054, Invitrogene)
- Biotase (L2193, Biochrom AG)
- Papain preparation (61,25 µg/ ml) (L2223, Biochrom AG)
- AccutaseTM cell detachment solution (21-201-0100V, Thermo Electron Corporation)

4.1.2.5 *Transfekční reagenty*

- FuGene[®] HD Transfection Reagent (04 709 705 001, Roche)
- jetPEITM Polymer-based DNA transfection reagent (101-01N, Bioparc)
- LipofectamineTM2000 (11668-027, InvitrogenTM)
- TransFectinTM Lipid Reagent (170-3351, Bio-Rad)
- TurboFectTM in vitro Transfection Reagent (R0531, Fermentas)

4.1.3 Restrikční endonukleázy

Seznam použitých restrikčních endonukleáz Tab. 2. (vše Fermentas)

Plasmid	Restrikční endonukleáza	Rozeznávaná sekvence	Teplota restrikce	Pufr
pPNT	EcoRI	G↓AATTC	37 °C	EcoR ⁺
	SmaI	CCC↓GGG	30°C	Tango-yellow
	SpeI (BcuI)	A↓CTAGT	37 °C	Tango-yellow
	AvaII (Eco47I)	G↓GW*CC	37 °C	Red

Tab. 2. Seznam restrikčních endonukleáz.

* W = A nebo T

4.1.4 Barvicí látky

- BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM
- Etidiumbromid: 1 mg/ml
- Hoechst 33342: 1 mg/ml
- Propidium jodid: 1 mg/ml
- Fast Red TR/Napthol AS-MX Alkaline Phosphatase Substrate Tablets Set (F4648, Sigma) – test přítomnosti alkalické fosfatázy

4.1.5 Antibiotika

- Geneticin: 50 mg/ml
- Ampicilin: výsledná koncentrace 100 µg/ml agaru
- Kanamycin: výsledná koncentrace 50 µg/ml agaru

4.1.6 Roztoky

- PBS (phosphate buffered saline): 136 mM NaCl, 1,5 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,25 mM KH₂PO₄, pH 7,35
- 2/3 PBS: 2 díly PBS:1 díl H₂O
- 4% formaldehyd v 2/3 PBS, pH 7,3
- 5x TBE (Tris-borát-EDTA): 200 mM Tris; 10 mM EDTA; 450 mM H₃BO₃, pH 8,0
- 2% cystein: 0,5 g cystein; 25 ml H₂O; pH 8,0
- 30 mM jodistan draselný + 70 mM chlorid sodný: 0,069 g KIO₄; 0,0409 g NaCl; 10 ml H₂O
- 1M DTT (dithiotreitol): 0,3085 g DTT; 2 ml H₂O
- DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma)
- 5-bromo-2-deoxyuridin (Sigma): 600 µg/ml H₂O

4.1.7 Ostatní materiál

- Filtrovací sítko CellTrics® 10 µm, sterile single packed (04-004-2324, Partec)
- Filtrovací sítko CellTrics® 20 µm, sterile single packed (04-004-2325, Partec)
- Filtrovací sítko Cell Strainer, 40 µm (352340, BD Falcon™)

4.1.8 Přístroje

- CO₂ inkubátor Sanyo MCP-18AIC (UV) (Sanyo electric)
- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40F (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Olympus IX 71 (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Wilovert® (WILL Wetzlar)
- Flow box EM Box 120 (Schoeller Instruments)
- Elektroforetický zdroj Consort E122 (Consort)
- Elektroforetický zdroj Power station 300 (Labnet Internacional)
- Vortex Ika Works, Minishaker MS1, (Ika Works)
- Vodní lázeň Techne TE 10D Tempette® (Techne)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Vyhřívavý blok Eppendorf ThermoStat Plus (Eppendorf)
- NanoDrop® ND-1000
- UV Transiluminátor TS-20E, 254 nm (UVP)
- CCD (Charge Coupled Device) černobílá kamera SPT-M320CE (Sony Corporation)
- Programy pro zpracování a analýzu obrazu DIPS a ACC (SOFO Brno)
- Transmisní elektronový mikroskop JEOL 1011
- Elektroporátor Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)
- FACS Vantage SE cell sorter (BD bioscience)

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace buněčné kultury *in vitro*

4.2.1.1 *Podmínky kultivace buněčné kultury*

Buňky jsou kultivovány v médiu, které se připravuje smícháním čerstvého kultivačního média (viz 4.1.2.1) s filtrovaným kondicionovaným médiem (médiem z již kultivovaných buněk) v poměru 1:1. Kultivace probíhá v termostatu při 28°C a v atmosféře 6% CO₂. Pasážování buněk bylo prováděno standardním postupem: po úplném odsátí média z kultivační nádoby byl na buňky aplikován roztok trypsin-EDTA (10x trypsin-EDTA v 2/3 PBS v poměru 1:9) na dobu cca 5 minut (po rozrušení adherentních spojů buňky volně plavou v roztoku) a poté je buněčná suspenze přenesena do zkumavky s čerstvým médiem. Po centrifugaci (10 min, 100 x g) a odstranění supernatantu se buněčný pelet resuspenduje a rozdělí do kultivačních lahví s připraveným kultivačním médiem.

4.2.1.2 *Uchovávání buněčných kultur*

V průběhu kultivace docházelo v jednotlivých pasážích k pravidelnému zamrazování buněk pro pozdější použití. Uvolnění adherentních buněk z kultivačního povrchu probíhá pomocí roztoku trypsin-EDTA (viz. 4.2.1.1). Po centrifugaci (10 min, 100 x g) a odstranění supernatantu jsou buňky resuspendovány v 1 ml čerstvého kultivačního média s 10% DMSO a přeneseny do kryozkumavek. Po 1 min působení DMSO následuje 20 min inkubace při -20°C, dále 4 hod -70°C a nakonec je kryozkumavka s buňkami umístěna ve skladovací nádobě s tekutým dusíkem (-196°C). Zde mohou být buňky skladovány po dobu několika let.

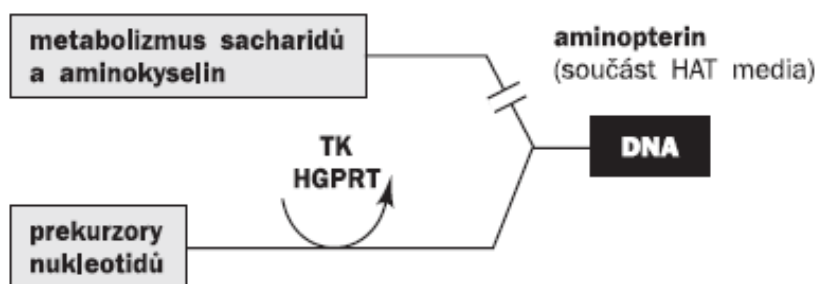
Pro opětovné kultivování buněk je kryozkumavka rychle rozmrazena a buňky přeneseny do zkumavky s čerstvým kultivačním médiem. Po centrifugaci (10 min, 100 x g) se resuspendovaný buněčný pelet přendá do kultivační nádoby s médiem. Buňky adherují k povrchu nádoby v intervalu cca 3-24 hodin (rychlost přichycení je závislé na typu buněk).

4.2.1.3 Testování zárodečných kmenových buněk

Zárodečné kmenové buňky byly testovány histochemickým testem na přítomnost alkalické fosfatázy. Alkalická fosfatáza je detekovatelná pomocí Fast Red TR/Napthol AS-MX Alkaline Phosphatase Substrate Tablets Set (F4648, Sigma). Prvním krokem detekce byla fixace buněk v roztoku 4% formaldehydu v 2/3 PBS po dobu 1 hod. Druhým krokem byla reakce se substrátem, který byl připraven dle instrukcí výrobce.

4.2.2 TK⁻ linie pre-Sertoliho buněk

TK⁻ linie buněk (buňky deficientní v thymidin kináze) se používají v bakteriální i buněčné genetice. Jejich příprava je založená na principu toxické syntézy, kde se využívá rezistence TK⁻ buněk k 5-bromo-2-deoxyuridinu (BrdU5). Jako negativní kontrola v tomto případě slouží kultivace TK⁻ buněk v přítomnosti HAT média (Littlefield, 1965) (Obr. 9). HAT médium (hypoxantin-aminopterin-thymidin médium) je selekční médium využívající kombinaci aminopterinu, látky blokující dráhu syntézy nukleotidů přes reakci bází s fosforibozopyrofosfátem, s přídavkem hypoxantinu a thymidinu, které slouží jako externí zdroje nukleotidů při syntéze DNA za účasti enzymů hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferázy (HGPRT) a thymidin kinázy (TK) (Obr. 9). Buňky, které nemají funkční ani jednu dráhu, nejsou schopny dělení, a proto z kultury vymizí.



Obr. 9. Selektce HAT.

Syntéza DNA může probíhat dvěma směry. Buď přes metabolismus sacharidů a aminokyselin nebo přes prekurzory nukleotidů. Aminopterin blokuje dráhu metabolismu. Enzymy thymidin kináza a hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy jsou nezbytné pro správný průběh syntézy DNA z nukleotidů. Buňka, která nemá funkční ani jednu dráhu není schopná dělení.

U myších TK^- buněk byly prováděny úspěšné studie o návratu k TK^+ fenotypu za pomoci purifikované DNA Herpes simplex viru, který obsahuje gen pro thymidin kinázu (Davidson *et al.*, 1973). Podobné studie probíhaly i na lidských buňkách (Bacchetti and Graham, 1977). Vytvoření TK^- linie pre-Sertoliho buněk by byl jeden z možných nástrojů oddělení zárodečných kmenových buněk a pre-Sertoliho buněk od sebe.

4.2.2.1 Příprava TK^- linie pre-Sertoliho buněk

K pre-Sertoliho buňkám na 6-ti dňkové destičce bylo přidáno 30 μg BrdU5 na 1 ml média. Druhý a třetí den byly buňky ozařovány UV světlem. Následující den bylo vyměněno médium. Kultivace buněk probíhala s BrdU5 (30 μg BrdU5/ml média) několik týdnů s výměnou média 1x týdně.

4.2.3 Vizualizace struktury kolonií na elektronovém mikroskopu

Struktura kolonií zárodečných kmenových buněk (a varlat samce *X. tropicalis*) byla vizualizována na transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) JOEL 1011 vybaveným CCD kamerou Veleta s akvizičním softwarem (Olympus Soft Imaging Solution GmbH).

4.2.3.1 Příprava preparátu pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Preparáty pro TEM byly připraveny pracovníky Laboratoře elektronové mikroskopie, PřF UK v Praze.

Material

Uvolnění buněk z kultivačního povrchu bylo provedeno roztokem trypsinem-EDTA (viz. 4.2.1.1). Buněčná suspenze byla přefiltrována přes sítko s velikostí ok 20 μm . Tím došlo k oddělení kolonií zárodečných kmenových buněk a pre-Sertoliho buněk.

Varlata samce *X. tropicalis* byla preparována ihned po usmrcení zvířete. Každé varle bylo rozříznuto na polovinu pro lepší prostoupení fixačního roztoku do středu vzorku.

Fixace a postfixace

Vzorky byly fixovány v 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru při 4°C po dobu 24 h. Po 12ti hodinovém promývání v 0,1 M PBS následovala postfixace 2% OsO_4 v 0,1 M PBS po dobu 2 h. Všechny uvedené kroky probíhaly při teplotě 4°C. Po dokončení fixace byly vzorky promyty 10 min destilovanou H_2O při RT.

Odvodnění

Odvodnění probíhá ve zvyšující se řadě ethanolu:

35% - 15 min

50% - 15 min

70% - 30 min

80% - 15 min

96% - 15 min

100% - 15 min

Po dokončení byly vzorky dehydratovány ve 100% acetonu po dobu 3x 15 min.

Zalévání preparátu do pryskyřice

Používaná pryskyřice Poly/Bed 812/Araldite 502 (Polysciences, Inc.) byla na postupné prosycení vzorků ředěna 100% acetonem a to následujícím způsobem:

3 (aceton): 1 (pryskyřice) - 2 h

1 (aceton): 1 (pryskyřice) - 4 h

1 (aceton): 3 (pryskyřice) - 12 h

Prosycení čistou pryskyřicí bylo prováděno 3x vždy po dobu 12 hod. Vzorky se poté zalily do forem s čistou pryskyřicí a nechaly tvrdnout v termostatu při 65°C po dobu 48 h.

Krájení a kontrastování

Tvrdé pryskyřicové bločky se vzorkem byly nařezány ultramikrotomem na 70 µm ultratenké řezy, které se přenesly na síťky, kde byly kontrastovány 2,5% vodným roztokem octanu uranylu po dobu 1 h a poté roztokem citrátu olova po dobu 15min.

Mikroskopování

Preparáty byly pozorovány pod transmisním elektronovým mikroskopem typu JEOL 1011 vybaveným CCD kamerou Veleta s akvizičním softwarem (Olympus Soft Imaging Solution GmbH).

4.2.4 Disociace kolonií zárodečných kmenových buněk

Zárodečné kmenové buňky vyrůstají na podpůrné vyživovací vrstvě pre-Sertoliho buněk pouze jako kompaktní kolonie, které je nutné pro další experimenty rozdělit na jednotlivé buňky.

4.2.4.1 *Mechanická disociace*

Kolonie zárodečných kmenových buněk byly krátkodobě kultivovány na Petriho miskách. Po odstranění média se kolonie mechanicky seškrabávaly tenkou skleněnou kapilárou s 2/3 PBS. Uvolněné kolonie byly přenášeny do důlkové destičky s připraveným médiem, kde byly kolonie resuspendovány opakovaným pipetováním. Po několik následujících dní bylo sledováno přisedání kolonií k podkladu a výskyt jednotlivých oddělených zárodečných kmenových buněk.

4.2.4.2 *Chemická disociace*

Druhým možným způsobem, jak získat jednotlivé buňky, bylo působením různých dezintegračních chemikálií na kolonie. U všech použitých sloučenin byl postup totožný. Z Petriho misek s narostlými koloniemi zárodečných kmenových buněk bylo odstraněno médium, buňky byly opláchnuty 2/3 PBS a pokryty dostatečným množstvím roztoku zkoušené

chemikálie. V průběhu následné inkubace byly kolonie několikrát protahovány pipetou, aby se usnadnilo jejich rozpadávání.

4.2.4.2.1 *Trypsin-EDTA*

Trypsin je serinová proteáza, která se účastní hydrolýzy proteinů v trávicím ústrojí mnoha obratlovců. Tento enzym štěpí převážně peptidové řetězce v karboxylové oblasti aminokyselin lysinu nebo argininu kromě případu, kdy je jedna z těchto aminokyselin následována prolinem. Pro disociaci buněk se většinou používá v kombinaci s chelatačním činidlem EDTA, které vyvazuje některé dvoumocné ionty (Ca^{2+} , Mg^{2+}), což vede k narušení vazby adhezivních buněčných molekul k povrchu. Pro experimenty uvedené v této práci byl použit roztok trypsin-EDTA s konečnou koncentrací 0,05% trypsin+0,02% EDTA.

4.2.4.2.2 *AccutaseTM*

AccutaseTM je unikátní směs proteolytických a kolagenolytických enzymů různých druhů bezobratlých živočichů. Ve srovnání s tryptinem je výhodou této směsi menší míra poškození buněk, která se projevuje vyšší životaschopností. Buněčné membrány a povrchové epitopy nejsou poškozeny a kvalita struktury a funkce povrchových proteinů tak zůstává nedotčena. Kombinace proteázové a kolagenolytické aktivity zvyšuje univerzálnost použití pro disociaci buněk a tkání různých druhů organismů. Pro pokusy byl použit roztok AccutaseTM v PBS s přídavkem 0,5 mM EDTA.

4.2.4.2.3 *Cystein*

Cystein se řadí mezi nepolární aminokyseliny s thiolovou skupinou (-SH) na konci postranního řetězce. Dvě thiolové skupiny vedle sebe vytvářejí kovalentní spojení ve formě disulfidických můstků (-S-S-). Přidáním cysteinu ke kultivovaným koloniím by došlo k zrušení disulfidických můstků mezi buňkami, popřípadě mezi buňkami a extracelulární matrix, a kolonie by se měli rozpadnout. Pro experimenty byl použit 2% vodný roztok cysteinu, pH 8.

4.2.4.2.4 *Dithiotreitol (DTT)*

DTT má stejné účinky jako cystein. Působí jako akceptor disulfidického spojení a tím ruší toto kovalentní spojení mezi buňkami. Pro pokusy byl použit 1 M roztok.

4.2.4.2.5 *Jodistan draselný (KIO_4)*

Jodistan draselný oxidační a štěpí sacharidy (α -dioly), což se projevuje rozrušením mezibuněčné vazby lektin-sacharid. Použit byl 30 mM roztok KIO_4 a pro zvýšení osmolarity byl přidán 70 mM NaCl.

4.2.4.2.6 *Biotase*

V současné době je dostupný ekvivalent enzymatické směsi AccutaseTM od firmy Biochrom (Německo), pod obchodním značkou Biotase. Tento produkt patří mezi dezintegrační enzymy s proteázovou aktivitou a je původem z mořských bezobratlých živočichů. Je doporučován pro disociaci buněk adherentních kultur s pomalejším a mírnějším účinkem než u jiných

enzymů. Zaručuje tudíž velmi citlivé oddělování buněk s minimálním poškozením. Enzymatickou aktivitu lze blokovat přidáním FBS, ale v mnoha případech to ani není nutné. Roztok je dodáván v koncentraci: 0,0042% proteáza + 0,02% EDTA.

4.2.4.2.7 *Papain*

Papain je hydrolyzující proteáza, která se získává z plodů papayi frakcionováním, odstředováním a ultrafiltrací. Používá se pro disociaci buněk a tkání. Ke štěpení molekul extracelulární matrix dochází do 10 min působení papainu na malý kousek tkáně. Proto je doporučováno použít k zastavení aktivity papainu inhibitor proteáz, aby nedošlo k úplné lýzy buněk. Pro pokusy byl použit roztok s přidavkem 0,5 mM EDTA a 1 mM L-cysteinu.

4.2.5 FACS

Fluorescenční průtoková cytometrie (FACS) umožňuje rozdělit více buněčných typů od sebe na základě stanovení rozptylu světla, případně fluorescence barviva nebo pomocí přítomnosti fluorescenčně značené protilátky. Pro oddělení zárodečných kmenových buněk a pre-Sertoliho buněk se využívalo odlišné velikosti těchto dvou buněčných typů a barvení bylo prováděno fluorescenčním barvivem Hoechst 33342. Výhodou techniky FACS je 99,9% úspěšnost čistoty vytríděné populace. V našem případě bylo hlavním cílem zjistit, zdali získáme čistou populaci zárodečných kmenových buněk, které bude možné použít při dalších pokusech.

4.2.5.1 Příprava vzorků pro FACS

Vzorky byly zpracovány v servisním pracovišti Fluorescenční průtokové cytometrie (Z. Cimbůrek) na Mikrobiologickém ústavu, Akademie věd České republiky za použití přístroje FACS Vantage SE cell sorter se softwarem BD CellQuest. Tříděné zárodečné kmenové buňky pocházely z buněčné kultury *Xenopus tropicalis* a z varlat samců *Xenopus laevis*.

4.2.5.1.1 Zárodečné kmenové buňky z kultury

Z kultivačních lahví s narostlými koloniemi zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* bylo odstraněno médium a po dobu 15 min byly buňky vystaveny působení papainu. Po centrifugaci (10 min., 100 x g) byl buněčný pelet resuspendován v 1 ml 2/3 PBS a zfiltrován přes 20 µm sítko, aby došlo k odstranění zbytků kolonií. Buněčná suspenze byla barvena fluorescenčním barvivem Hoechst 33342 (1 mg/ml) v konečné koncentraci 5 µg/ml po dobu 2 h při teplotě 28°C. Bezprostředně před tříděním byly k buněčné suspenzi přidány 3 µl propidium jodidu (1 mg/ml) pro identifikaci mrtvých buněk.

4.2.5.1.2 Zárodečné kmenové buňky *X. laevis*

Čerstvě preparovaná a očištěná varlata samců *X. laevis* byla inkubována 30 min při 28°C za stálého třepání v 10 ml média bez FBS a s přidavkem 100 µl kolagenázy (50 mg/ml) a 50 µl DNázy (1 mg/ml). Poté byla varlata 30x protažena pipetou a obsah zkumavky byl filtrován přes sítko s velikostí oka 40 µm. Zachycené semenotvorné kanálky se umístily do 10 ml čerstvého média bez FBS se 100 µl kolagenázy (50 mg/ml) a 50 µl DNázy (1 mg/ml), inkubační doba 30 min při 28°C za stálého třepání. Takto připravená buněčná suspenze byla doplněna na objem 20 ml a poté centrifugována 10 min při 110 x g.

Buněčný pelet se resuspendoval v 20 ml média a centrifugace se znovu opakovala. Nyní byl buněčný pelet resuspendován v 10 ml 2/3 PBS a tato suspenze byla filtrována 40 μ m sítkem. Filtrát byl opět centrifugován (10min, 110 x g), pelet resuspendován v 1 ml 2/3 PBS a po přidání 5 μ l Hoechst 33342 (1 mg/ml) a 7,5 μ l DNázy (1 ml/ml) následovala inkubace vzorku 2 h při 28°C. Mrtvé buňky byly před tříděním barveny 3 μ l propidium jodidu (1 mg/ml).

4.2.6 Transfekce buněk

4.2.6.1 Typy transfekovaných buněk

Transfekovány byly tři buněčné typy. Jednalo se o pre-Sertoliho buňky a zárodečné kmenové buňky z dlouhodobě rostoucí kultury odvozené z varlat juvenilního samce *X. tropicalis* a buňky z embryonální linie *Xenopus laevis*.

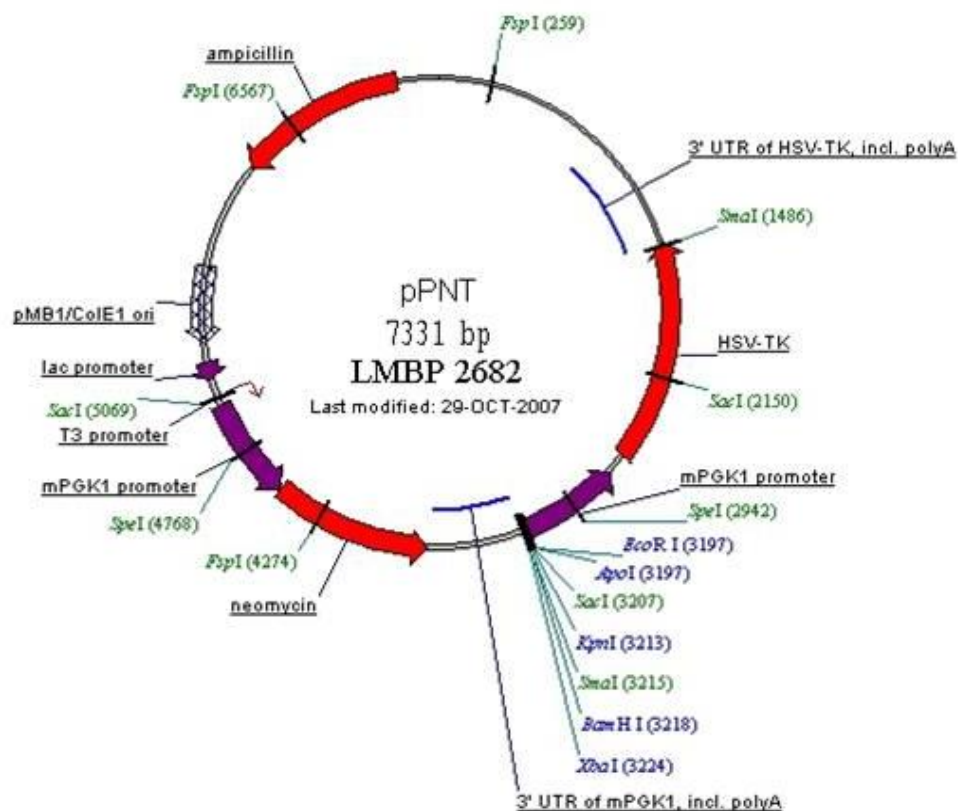
4.2.6.2 Plasmidy

Podrůnná vyživovací vrstva z pre-Sertoliho buněk byla transfekována dvěma různými plasmidy, pPNT a pEGFP-N3.

4.2.6.2.1 pPNT

Plasmid pPNT o velikosti 7331 bp obsahuje několik selekčních systémů (Obr. 10). Ampicilinová rezistence slouží k amplifikaci plasmidu v bakteriích. Selekční gen pro neomycin fosfotransferázu způsobuje odolnost vůči G418 (geneticin), proto se velmi často využívá při transfekci buněk jako pozitivní

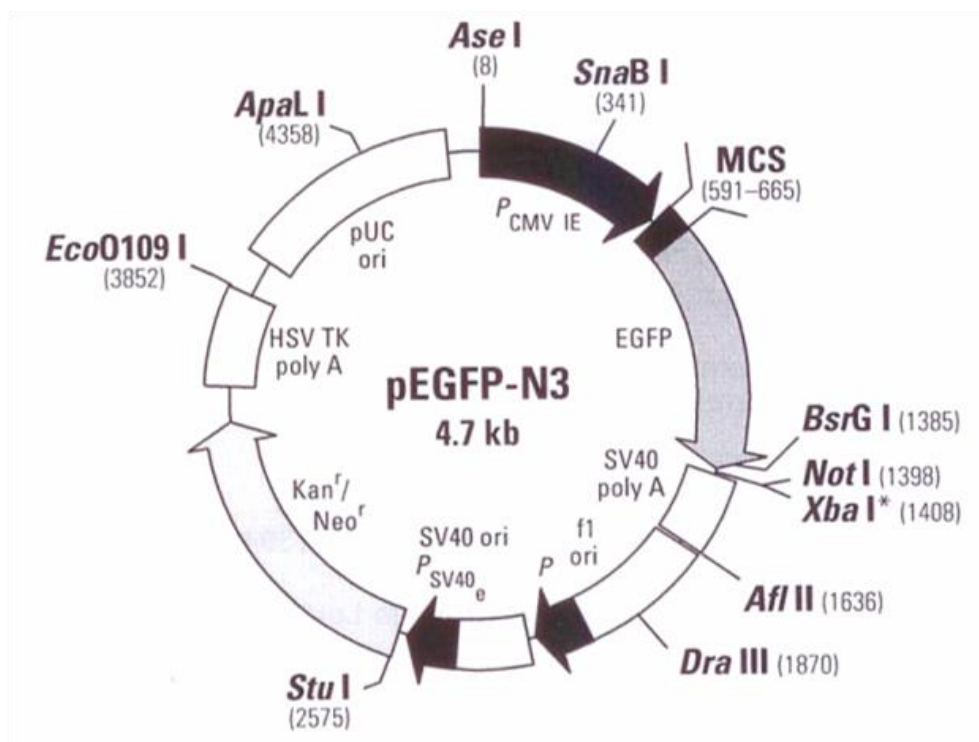
selekční marker. Gen pro thymidin kinázu *Herpes simplex* viru po interakci s ganciklovirem způsobuje přes blokaci syntézy DNA latenci buněk.



Obr. 10. Schéma plasmidu pPNT.

4.2.6.2.2 *pEGFP-N3*

Druhým použitým plasmidem byl pEGFP-N3 (Obr. 11). Oproti pPNT se jedná o velikostně menší plasmid (4700 bp) obsahující kanamycinovou, neomycinovou rezistenci a reportérový gen GFP.



Obr. 11. Schéma plasmidu pEGFP-N3.

4.2.6.2.3 Amplifikace a izolace plasmidu

Plasmidy byly amplifikovány v bakteriích One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (C404010, Invitrogen). Transfekce bakterií byla provedena dle instrukcí dodavatele. Úspěšně transfekované bakterie byly vysety na agarové plotny s příslušným antibiotikem a inkubovány do druhého dne v termostatu při 37°C. Vybrané kolonie byly přečárkovány na agarové plotny s odpovídajícím antibiotikem a opět kultivovány v termostatu při 37°C přes noc.

Izolace plasmidové DNA z bakteriálních klonů byla provedena pomocí NucleoSpin® Plasmid kitu (740588.250, Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce. Plasmidová DNA byla eluována do objemu 50 µl a její koncentrace byla změřena na nanodropu.

4.2.6.2.4 *Kontrola plasmidů*

Sekvence izolovaných plasmidů byla ověřena pomocí štěpení restričními endonukleázami (viz. Tab. 2). Postup byl následující: reakční směs tvořená 100-200 ng vzorku spolu s 2 μ l pufru, 1 μ l restriční endonukleázy a vodou doplněnou do celkového objemu 20 μ l byla inkubována při teplotě odpovídající enzymu po dobu 90 min. Poté byla ke vzorkům přidána BFM (1/4 objemu reakce) a velikost fragmentů byla ověřena na 1,5% agarózovém gelu s 1/1000 etidiumbromidu. Jako velikostní DNA marker byl použit Gene Ruler DNA Ladder mix (SM0333, Fermentas).

4.2.6.3 *Elektroporace*

Do 3-4 mm úzkých elektroporačních kyvet obsahujících 0,5 ml média s pre-Sertoliho buňkami a 0,5 ml deionizované H₂O bylo přidáno 0,5 – 1,0 μ g plasmidu pEGFP-N3. Podmínky elektroporace byly následující: 6 pulzů, interval pulzu 1 s, délka pulzu 50 ms, napětí od 6V do 200V, typ elektroporátoru Gene Pulser Xcell. Bezprostředně poté byly buňky přeneseny do kultivačního média.

4.2.6.4 *Lipofekce*

Druhý způsob transfekce využívá schopnosti procházení lipidických váčků přes plasmatickou membránu buňky. Z důvodu různého složení lipidických váčků a tím i různé účinnosti transfekce buněk bylo vyzkoušeno několik transfekčních reagentů. U všech postupů byly pre-Sertoliho buňky krátkodobě kultivovány (1 den) s médiem bez antibiotik tak, aby výsledná buněčná hustota při transfekci odpovídala 70 – 90% nárůstu buněk. Z důvodu větší účinnosti a menší letality buněk byl u každé reagentie optimalizován

poměr plasmidové DNA (μg) ku transfekční látce (μl). Postupy práce s jednotlivými reagensy jsou popsány níže a uvedené hodnoty odpovídají jednomu důlku na 6ti důlkové destičce.

4.2.6.4.1 *LipofektaminTM2000, TransFektinTM*

Postup transfekce LipofektaminemTM2000 a TransFektinemTM je shodný. Do jedné ze dvou připravených zkumavek s 250 μl přípravného transfekčního média byly přidány 2 μg plasmidu a do druhé 4 μl LipofektaminuTM2000 (popřípadě TransFektinuTM). Po inkubaci 5 min došlo ke spojení obsahu zkumavek a následovala 20 min inkubace. Na závěr byla kompletní transfekční směs s 2 ml transfekčního média aplikována na buňky. Po 4 h kultivaci bylo vyměněno médium za standardní kultivační médium.

4.2.6.4.2 *FuGene[®]HD Transfection Reagent, TurboFectTM*

K 100 μl přípravného transfekčního média byly přidány 2 μg plasmidu a poté 4 μl FuGene[®] reagentie (TurboFectTM reagentie). Po inkubaci 15 min při RT se lipofekční směs přenesla k připraveným pre-Sertoliho buňkám s 2 ml transfekčního média bez antibiotik. Výměna transfekčního média za čerstvé kultivační médium proběhla po čtyřech hodinách inkubace.

4.2.6.4.3 *jetPEITM (Polymer-based DNA transfection reagent)*

6 μl jetPEITM s 150 mM NaCl v celkovém objemu 100 μl byl přidán k 3 μg plasmidové DNA se 150 mM NaCl v celkovém objemu 100 μl . Směs se nechala inkubovat 30 min a poté byla přidána k buňkám s 2 ml transfekčního

média. Stejně jako u ostatních transfekčních reagensí bylo po 4 h médium vyměněno za čerstvé kultivační médium.

4.2.6.5 *Selekce transfekovaných buněk*

Vzhledem k tomu, že oba plasmidy obsahují gen pro neomycin fosfotransferázu, byla jako pozitivní selekce transfekovaných buněk použita jejich rezistence vůči geneticinu. Dva dny po transfekci bylo k buňkám přidáno 400 µg geneticinu na 1 ml média. Tato počáteční koncentrace byla během kultivace postupně snižována až na udržovací selekční hladinu 100 µg/ml.

4.2.6.6 *Analýza a zpracování obrazu*

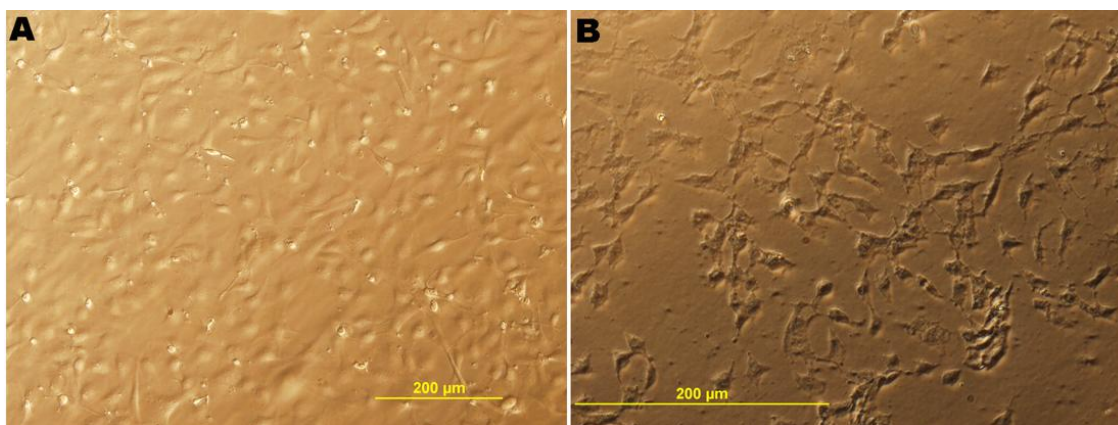
Úspěšně transfekované buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 71 s DP Controller kamerou. Pro zpracování obrazu byl použit příslušný software Olympus.

5 VÝSLEDKY

5.1 TK⁻ linie pre-Sertoliho buněk

Jedním z možných nástrojů jak oddělit kolonie zárodečných kmenových buněk od podpůrné vyživovací vrstvy pre-Sertoliho buněk bylo připravení TK⁻ buněčné linie pre-Sertoliho buněk. Předpokladem bylo, že TK⁻ buňky nejsou schopny fosforylovat 5-bromo-2-deoxyuridin na 5-bromouridinfosfát, a proto jsou rezistentní vůči jeho toxickým účinkům, tzn. V médiu s BrdU-5 by měly proliferovat pouze mutantní buňky. Všechny dosavadní postupy přípravy TK⁻ buněčných linií se u různých druhů obratlovců lišily v koncentraci 5-bromodeoxyuridinu, a proto byly pokusy prováděny při různých koncentracích.

Při optimalizovaných reakčních hodnotách BrdU-5 30 µg/ml média a době ozařování 2x 15 min se podařilo připravit buňky, které proliferovaly v selekčním médiu s BrdU-5. Růst této kultury byl však velmi pomalý a po dvou měsících se zcela zastavil. Další dva měsíce buňky v médiu s BrdU-5 přežívaly, ale jejich počet zůstával stejný. V porovnání s nemutovanými pre-Sertoliho buňkami byla velikost TK⁻ buněk menší a jejich tvar nezůstal úplně stejný (Obr. 12). Při pasážování TK⁻ buněk byla vyzkoušena ředící řada roztoku trypsin-EDTA (1x trypsin-EDTA v deionizované H₂O v poměru 2:1, ředěno 2/3 PBS v poměru 1:0, 1:4, 1:9). Po rozrušení adherentních spojů a přenesení buněk již nedošlo k jejich opětovnému přichycení, což bylo důvodem ztráty této kultury.

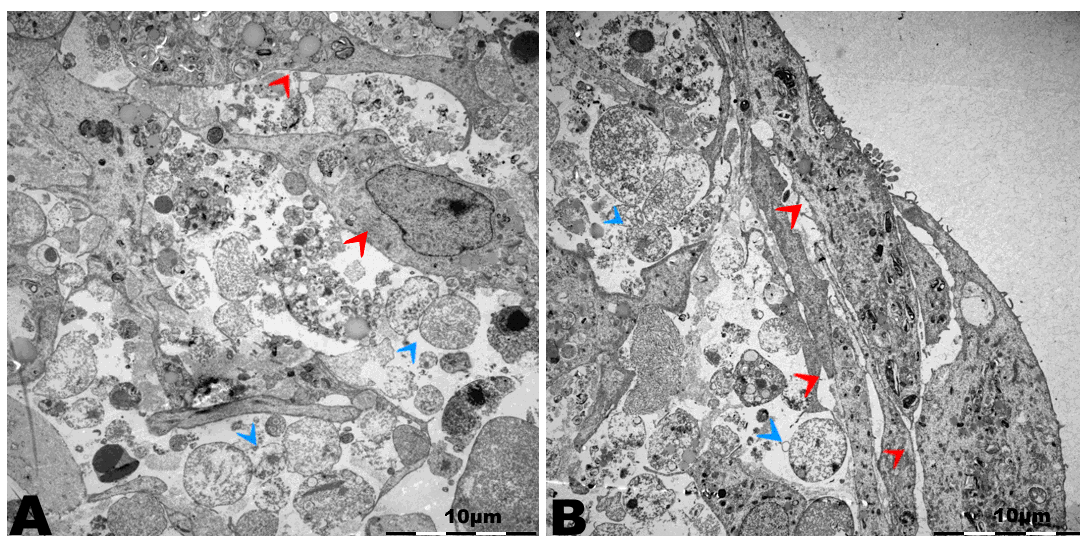


Obr. 12. TK⁻ linie pre-Sertoliho buněk (měřítko odpovídá 200 μm).

- A) pre-Sertoliho buňky.
- B) TK⁻ linie pre-Sertoliho buněk.

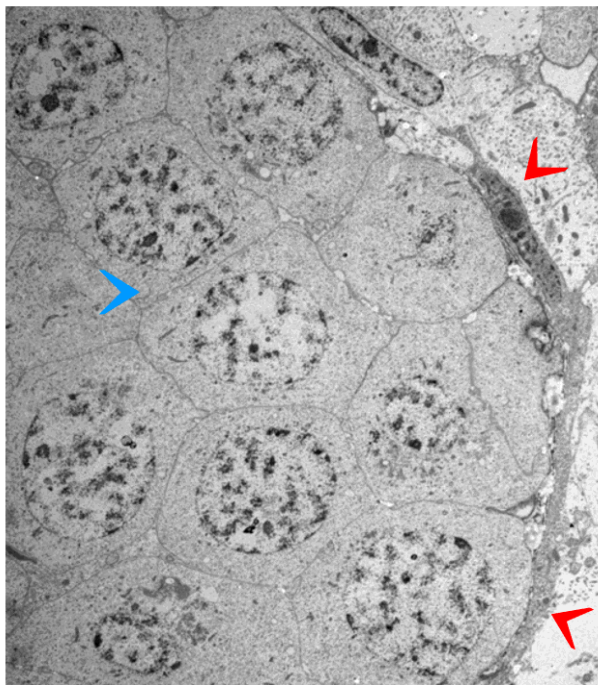
5.2 Vizualizace struktury kolonií pomocí TEM

Struktura kolonií zárodečných kmenových buněk a varlat *X. tropicalis* byla vizualizována na transmisním elektronovém mikroskopu JOEL 1011 s CCD kamerou a příslušným softwarem (Soft Imaging Solution GmbH Olympus). Tento krok přispěl k objasnění složení a rozmístění buněk v koloniích (Obr. 13) a zároveň umožnil tuto stavbu porovnat se strukturou semenotvorných kanálků varlat (Obr. 14).



Obr. 13. Struktura kolonií zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* (červené šipky – pre-Sertoliho buňky, modré šipky – zárodečné kmenové buňky) (měřítko odpovídá 10 μm).

- A) Střed kolonie obsahuje, jak zárodečné kmenové buňky, tak i pre-Sertoliho buňky a velké množství extracelulární matrix.
- B) Okraj kolonie s vrstvou pre-Sertoliho buněk po obvodu.



Obr. 14. Uspořádání Sertoliho buněk (červené šipky) a zárodečných kmenových buněk (modrá šipka) uvnitř semenotvorného kanálku varlete *X. tropicalis* (zvětšeno 2500x).

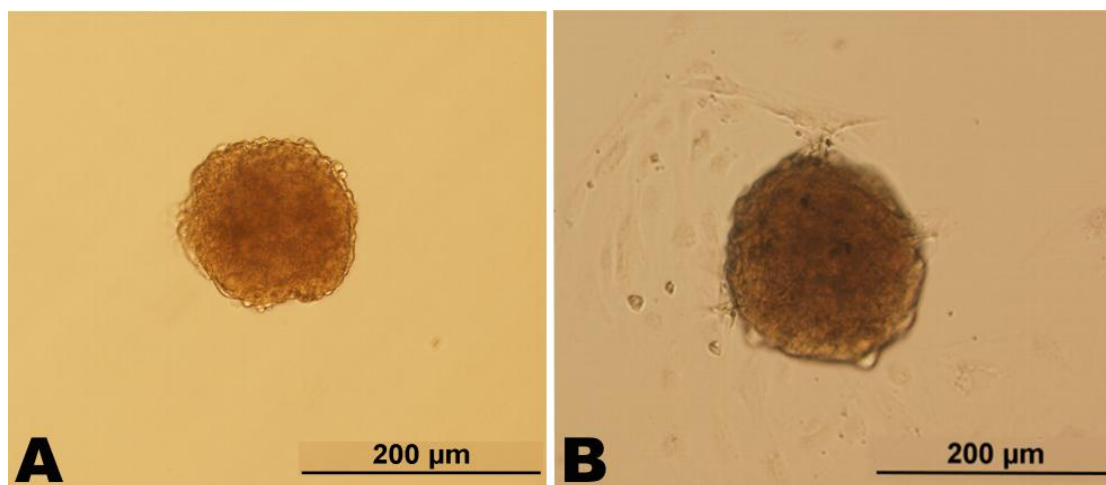
Shluk vyvíjejících se zárodečných buněk (spermatogonií) je po odvodu lemován vrstvou Sertoliho buněk.

5.3 Disociace kolonií zárodečných kmenových buněk

5.3.1 Mechanická disociace

Kolonie zárodečných kmenových buněk byly mechanicky oddělovány od pre-Sertoliho buněk a následně přenášeny na kultivační povrch, který již neobsahoval podpůrnou vyživovací vrstvu. Protahováním kolonie skleněnou pipetou byla snaha docílit rozdělení na jednotlivé buňky. K tomu však nedošlo a již druhý den po přenesení byly celé kolonie zárodečných kmenových buněk přichyceny ke kultivačnímu povrchu a v jejich bezprostřední blízkosti se

nacházely pre-Sertoliho buňky (Obr. 15). Ani po opakovaném přenášení jednotlivých kolonií nedošlo k eliminaci výskytu pre-Sertoliho buněk.



Obr. 15. Manuální přenášení kolonií zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis*.

- A) Kolonie zárodečných kmenových buněk po mechanickém oddělení a přenesení.
- B) Kolonie po dvou dnech kultivace od mechanického oddělení a přenesení. Na snímku jsou patrné pre-Sertoliho buňky, které se vyskytují vždy v bezprostřední blízkosti kolonií.

Tento výsledek poukázal na přítomnost pre-Sertoliho buněk uvnitř kolonií zárodečných kmenových buněk. Zároveň bylo zjištěno, že jde o zcela neúčinný přístup v rámci disociace kolonií na jednotlivé zárodečné buňky a oddělení obou buněčných typů od sebe.

5.3.2 Chemická disociace

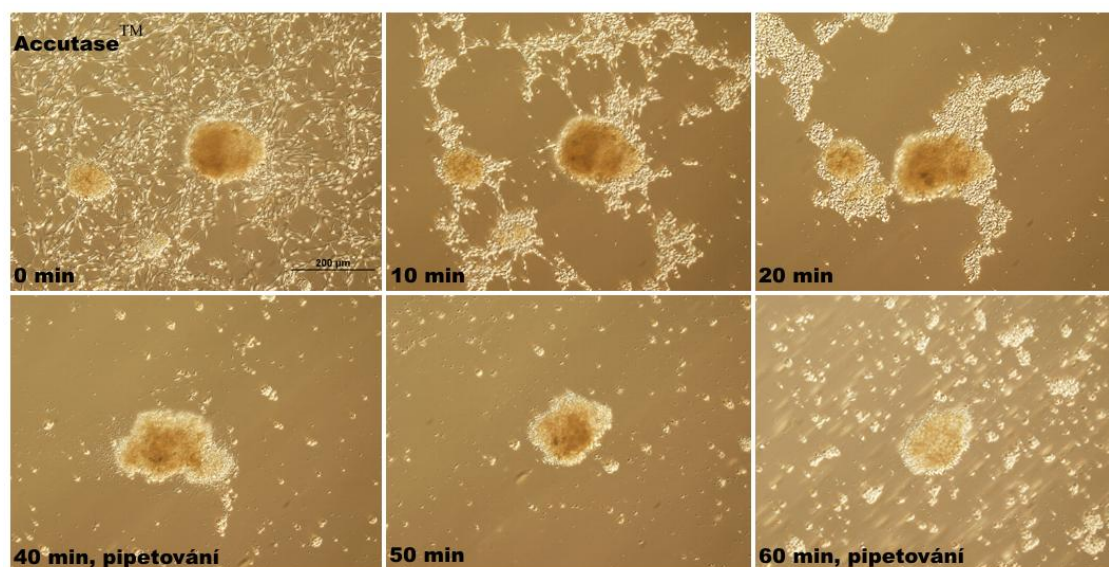
Vedle neúspěšné mechanické disociace byl zkoušen i další přístup, jak rozdělit kolonie zárodečných kmenových buněk na jednobuněčnou suspenzi. Jednalo se o působení různými dezintegračními látkami. Předpokladem bylo, že tyto látky rozruší mezibuněčné spoje, popřípadě spoje s extracelulárním matrix.

V různých časových intervalech bylo zaznamenáváno působení jednotlivých chemikálií a zároveň byly v závěru kolonie opakovaně pipetovány, aby se usnadnilo jejich rozpadávání.

5.3.2.1 *Accutase*TM

Z výsledků je patrné, že i po inkubaci 60 min působení *Accutase*TM nedošlo k rozpadu kolonií zárodečných kmenových buněk (Obr. 16).

Stejný negativní výsledek jako u *Accutase*TM byl pozorován i u DTT, roztoku cysteinu, KIO_4 a roztoku trypsin-EDTA.

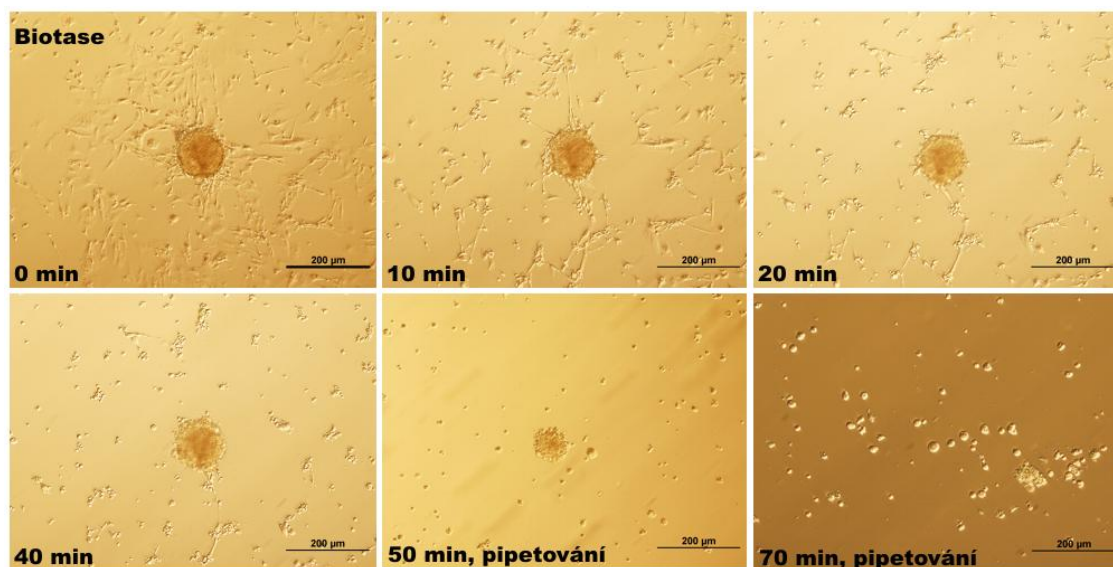


Obr. 16. Působení *Accutase*TM na kolonie zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* (měřítko odpovídá 200 μm).

Působení *Accutase*TM bylo zaznamenáváno v časech 0, 10, 20, 40, 50 a 60 min. Po 40 min a 60 min byly kolonie protahovány pipetou, aby se usnadnilo jejich rozpadávání. Z výsledků vyplývá, že i po hodině inkubace kolonií zárodečných kmenových buněk s *Accutase*TM nedošlo k jejich rozpadu.

5.3.2.2 Biotase

Ani po působení látky Biotase nedošlo k úplnému rozpadu kolonií, nicméně velikost dokumentované kolonie se výrazně zmenšila v průběhu inkubační doby. Okraj kolonie přestával být kompaktní a v okolí kolonie byly zřetelné buňky různých velikostí, přesto nedošlo k jejich úplnému rozpadu (Obr. 17).

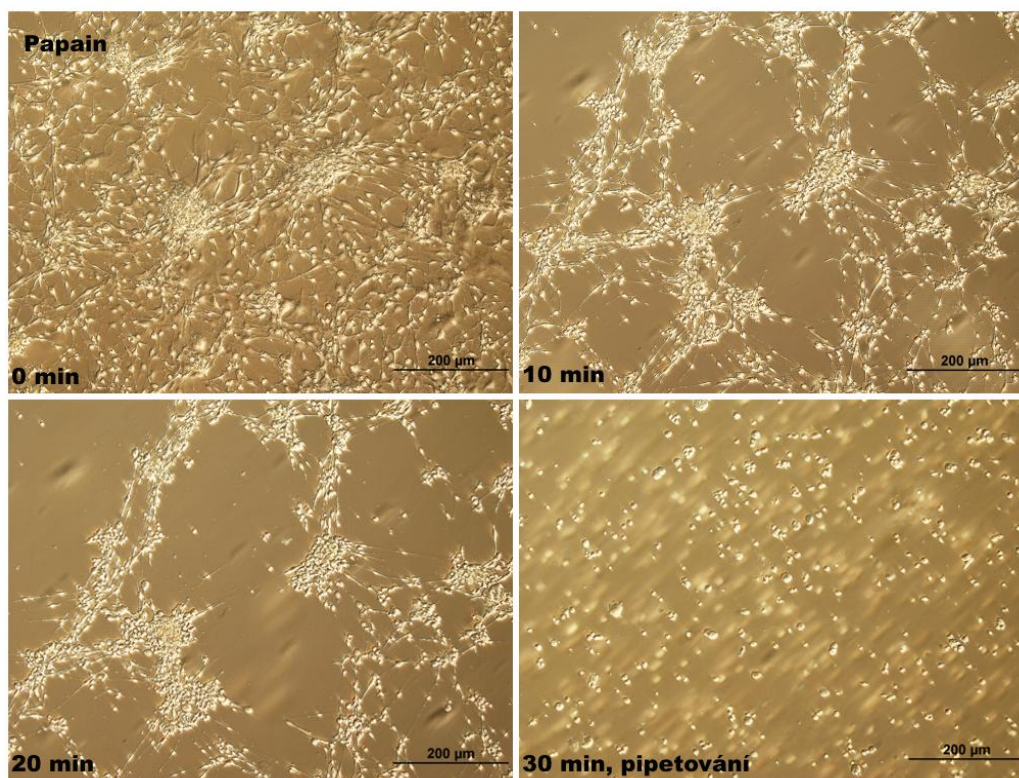


Obr. 17. Rozpad kolonií zárodečných kmenových buněk vlivem působení Biotase (měřítko odpovídá 200 μm).

Kolonie zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* byly inkubovány s dezintegrační látkou Biotase a v časech 0, 10, 20, 40, 50, 70 min se zaznamenával její účinek. V době 50 a 70 min byly kolonie opakovaně pipetovány, aby se usnadnilo jejich rozpadávání. Jednotlivé buňky se postupně uvolňovaly z okraje kolonie, ale ani po 70 min působení nedošlo k jejímu úplnému rozpadu.

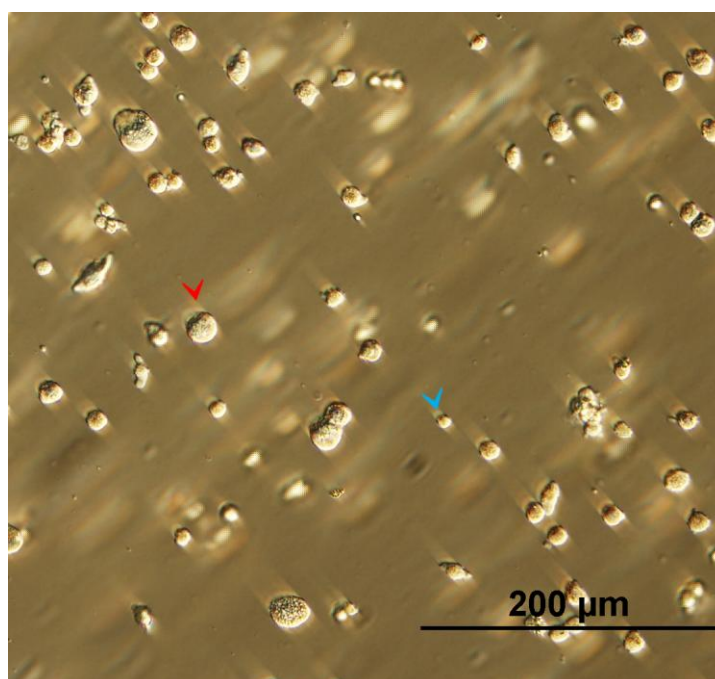
5.3.2.3 Papain

Z výsledků působení roztoku papainu je patrné, že již po inkubaci 30 min s opakovaným pipetováním došlo k úplnému rozpadu kolonií zárodečných kmenových buněk na jednotlivé buňky (Obr. 18). V suspenzi byly zřetelné jednotlivé typy buněk a na základě jejich velikosti bude možné buňky od sebe oddělit (Obr. 19).



Obr. 18. Disociace kolonií zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* působením papainu (měřítko odpovídá 200 µm).

Kolonie zárodečných kmenových buněk byly inkubovány s papainem a v časech 0, 10, 20 a 30 min se zaznamenával účinek. Po uplynutí 30 min byly kolonie protahovány pipetou. Z výsledků je patrné, že již po půl hodině inkubace kolonií s papainem došlo k jejich úplnému rozpadu.

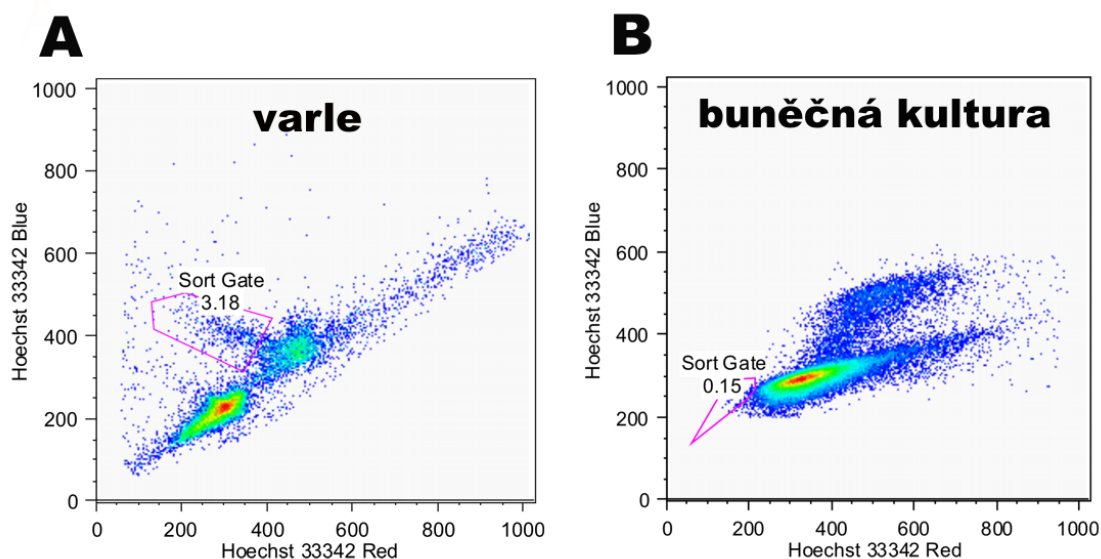


Obr. 19. Detail buněčné suspenze pre-Sertoliho buněk (červená šipka) a zárodečných kmenových buněk (modrá šipka).

Po 30 min působení papainu na smíšenou kulturu *X. tropicalis* složené z pre-Sertoliho buněk a kolonií zárodečných kmenových buněk, dochází k rozpadu na jednobuněčnou suspenzi. Jednotlivé typy buněk lze od sebe oddělit na základě jejich velikosti.

5.4 FACS

Smíšená kultura pre-Sertoliho buněk a kolonií zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* byla pomocí papainu disociována na jednobuněčnou suspenzi a tříděna na fluorescenčním průtokovém cytometru (Obr. 20B). Jako kontrolní vzorek byla zvolena smíšená populace buněk varlat dospělého samce *X. laevis* (Obr. 20A).



Obr. 20. Třídění buněk na fluorescenčním průtokovém cytometru (A – buněčná populace z varlete *X. laevis*, B – buněčná populace z buněčné kultury *X. tropicalis*).

Měřeno v lineární stupnici. Souřadnice x znázorňuje červenou fluorescenci barvy Hoechst 33342 (UV excitace, emisní filtr 450/50), y souřadnice znázorňuje modrou fluorescenci (UV excitace, emisní filtr 660/20). V obou případech Sort Gate označuje tříděné diploidní kmenové buňky a jejich procentuální zastoupení v celkové populaci živých buněk.

A – buněčná populace z varlete *X. laevis*: z pohledu modré fluorescence se na úrovni Sort Gate nacházejí diploidní buňky, pod nimi leží haploidní spermatidy a nad nimi tetraploidní buňky s duplikovanou DNA. Celkově vytříděno 7867 kmenových buněk.

B – buněčná populace ze smíšené kultury *X. tropicalis*: z pohledu modré fluorescence se na úrovni Sort Gate nacházejí diploidní buňky a nad nimi leží tetraploidní buňky S/M fáze buněčného cyklu. Celkově vytríděno 3891 kmenových buněk.

Převážná část úspěšně vytríděných zárodečných kmenových buněk, jak z *in vitro* kultury, tak i z varlat, byly transfekovány plasmidem pEGFP (viz. 5.5.2.3). Zbylá část buněk byla podrobena histochemickému testu na přítomnost alkalické fosfatázy. Její přítomnost je jedním ze znaků zárodečných kmenových buněk (Hahnel *et al.*, 1990; MacGregor *et al.*, 1995). Na základě pozitivní reakce alkalické fosfatázy jsou tyto buňky považovány za zárodečné kmenové buňky.

5.5 Transfekce buněk

Pro optimalizaci postupu transfekce byly zvoleny pre-Sertoliho buňky z důvodu snadné manipulace s jejich kulturou.

5.5.1 Elektroporace

Elektroporace je jedním z možných technik transfekce. Vychází z předpokladu, že působením elektrického pulzu buněčná membrána permeabilizuje, a tak může do buňky vstoupit v okolí přítomný plasmid či DNA konstrukt. U žab rodu *Xenopus* tento přístup umožňuje časové a lokální naplánování *in vivo* transgeneze (Eide *et al.*, 2000, Ikuzawa *et al.*, 2006).

Při elektroporaci pre-Sertoliho buněk plasmidem pEGFP-N3 byla vyzkoušena řada elektroporačního napětí v rozmezí 6V – 200V. Během pokusů se však nepodařilo najít optimální hodnotu napětí. Při hodnotách do

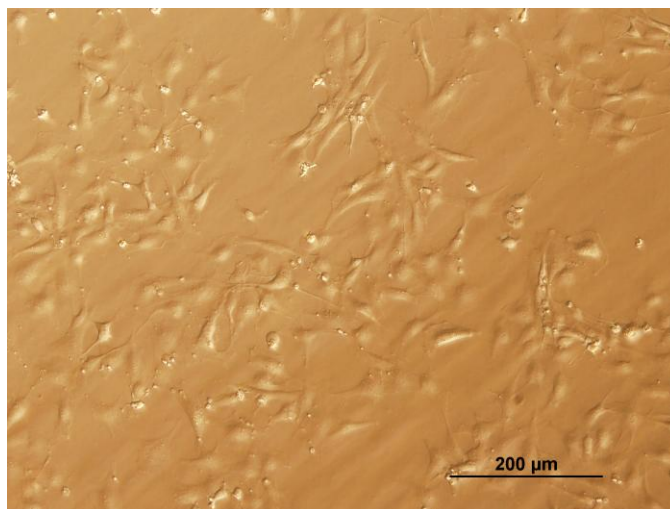
150V po zásahu přežívalo 50% buněk, ale úspěšnost transfekce byla 0%. Při napětí nad 150V byl zásah natolik silný, že způsobil 100% úmrtnost pre-Sertoliho buněk.

5.5.2 Lipofekce

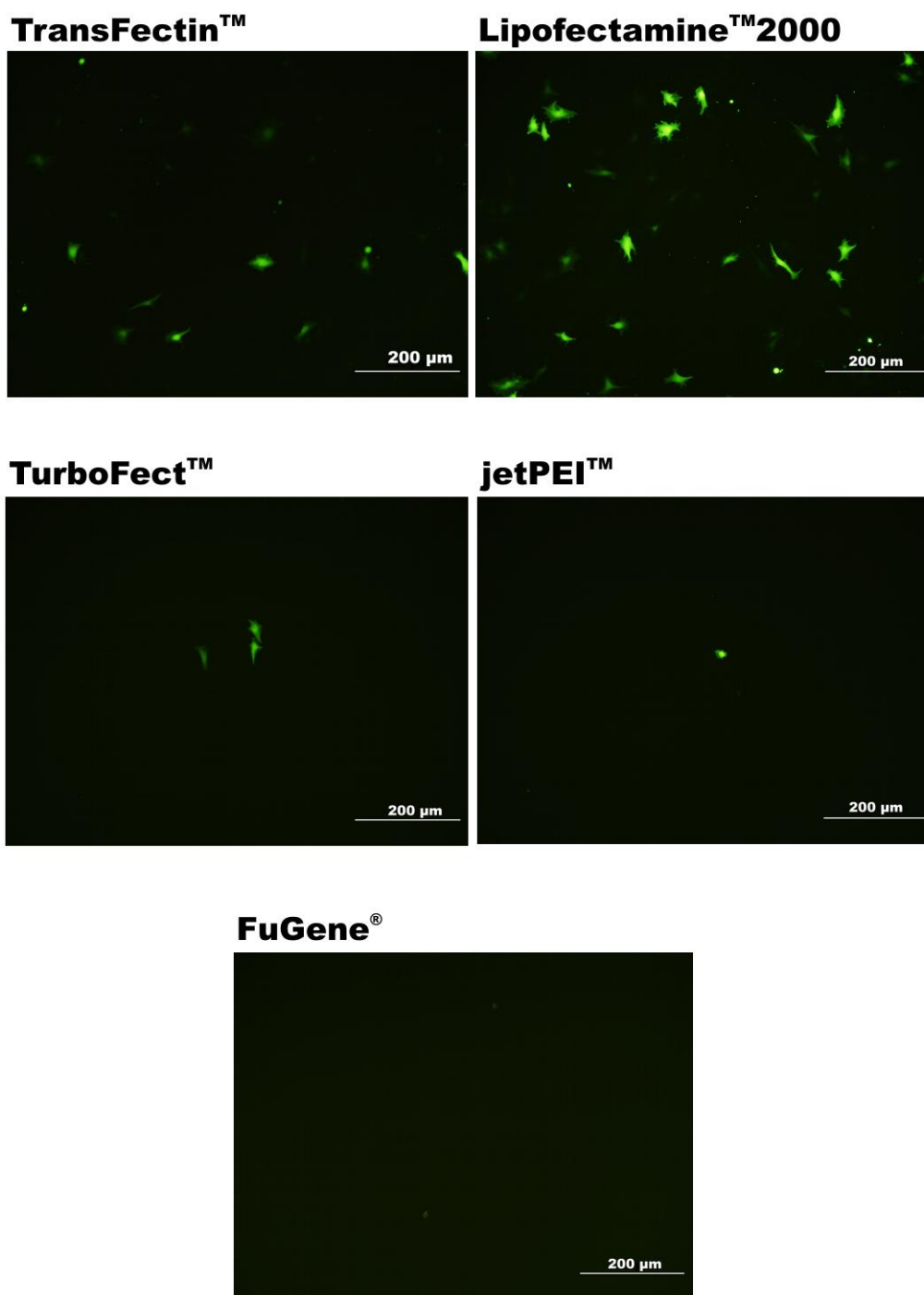
Plasmatická membrána je tvořena fosfolipidovou dvouvrstvou, která umožňuje průchod lipidických váčků. Vzhledem k různému složení lipofekčních činidel je i účinnost transfekce buněk odlišná.

5.5.2.1 Lipofekce *pre-Sertoliho buněk*

Pro optimalizaci lipofekce žabích buněk bylo vyzkoušeno několik reagensů společně s plasmidem pEGFP. Konfluence pre-Sertoliho buněk před transfekcí byla cca 80%. Následující den byly buňky pozorovány fluorescenčním mikroskopem a u všech reagensů byla úmrtnost okolo 20% (Obr. 21). Po několikadenní kultivaci byla zhodnocena míra úspěšnosti zkoušených lipofekčních činidel (Obr. 22).



Obr. 21. Hustota pre-Sertoliho buněk na kultivačním povrchu druhý den po transfekci (zvětšení 100x).



Obr. 22. Transfekce pre-Sertoliho buněk *X. tropicalis* různými lipofekčními reagensii (měřítko odpovídá 200 μm).

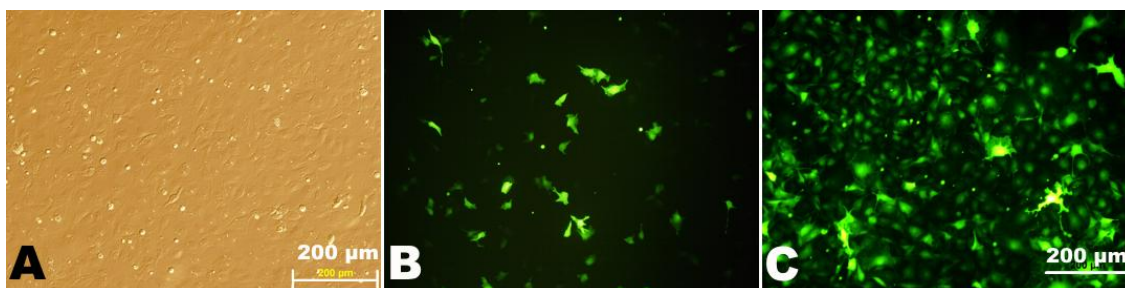
Tři dny po transfekci byl vyhodnocen účinek jednotlivých lipofekčních reagensii. Nejvyšší úspěšnost byla pozorována u Lipofectamine™2000. Druhý nejúčinnější byl TransFectin™. U ostatních činidel TurboFect™, jetPEI™ a FuGene® byla úspěšnost lipofekce příliš nízká až nulová.

Pomocí rostoucí řady lipofekční reagentie (5 μ l, 7 μ l, 9 μ l, 11 μ l, 13 μ l, 15 μ l) spolu se stálým množstvím plasmidu (2,5 μ g) byl stanoven optimální poměr plasmidu vůči lipofekční reagenicii TransFectinTM na 1 μ g : 2 μ l se 40% úspěšností, se zvyšujícím se poměrem úspěšnost lipofekce klesala až téměř k 0%. Bylo dokázáno, že z krátkodobého hlediska je nejúčinnější lipofekční reagentie LipofektamineTM2000. Avšak po dlouhodobé kultivaci a selekci transgenních buněk se ukázalo, že vyšší viabilitu vykazují buňky transfekované pomocí TransFectinTM.

Pro transfekci pre-Sertoliho buněk byl použit i plasmid pPNT. Tento plasmid obsahuje dvojistou selekci, která se zdála být vhodným nástrojem pro oddělení zárodečných kmenových buněk od podpůrné vyživovací vrstvy. Po transfekci a následné selekci v médiu s geneticinem došlo k postupnému odumírání buněk až zcela vymizely. Vzhledem k tomu, že tento plasmid neobsahuje GFP marker, není jasné, jestli byla lipofekce úspěšná nebo zda nebyl selekční tlak pro transfekované buňky letální.

5.5.2.2 Transfekce embryonální linie *X. laevis*

Cílem tohoto pokusu bylo porovnat úspěšnost lipofekce pre-Sertoliho buněk *X. tropicalis* s buňkami embryonální linie *X. laevis*, které nepodléhají Hayflickovu limitu a měly by být více odolné vůči manipulacím. K tomuto účelu byl použit plasmid pEGFP a transfekční reagentie TransFectinTM. Po transfekci a jejich dlouhodobé kultivaci v selekčním médiu s geneticinem došlo k úspěšnému vytvoření linie buněk *X. laevis*, které exprimují GFP (Obr. 23).

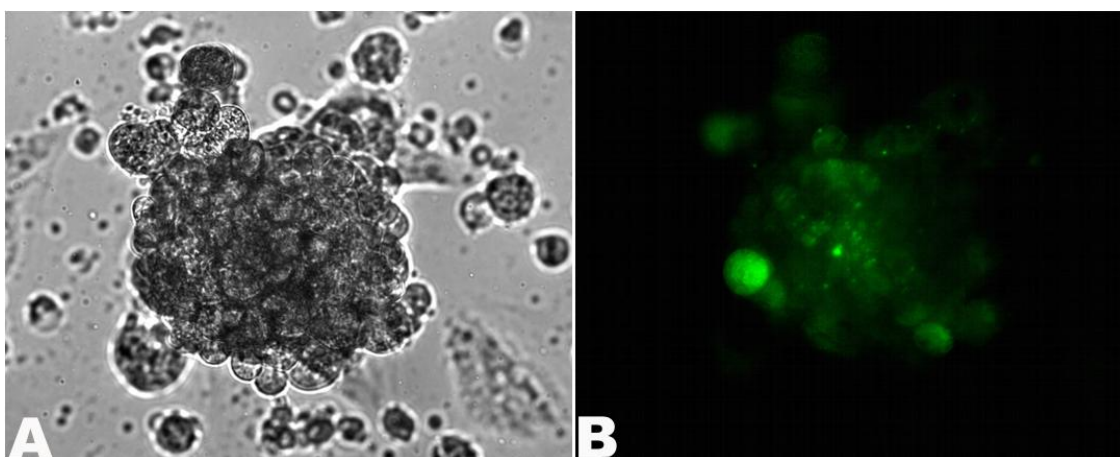


Obr. 23. Lipofekce buněk embryonální linie *X. laevis* (měřítko odpovídá 200 μ m).

- A) Adherentní vrstva buněk embryonální linie den po transfekci.
- B) Úspěšně transfekované buňky plasmidem pEGFP-N3 den po transfekci.
- C) Transgenní linie buněk kultivované po 4 měsíce v selekčním médiu obsahující geneticín.

5.5.2.3 Transfekce zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis*

Zárodečné kmenové buňky, které byly vytříděny pomocí FACS (viz. 5.4), byly transfekovány plasmidem pEGFP-N3 pomocí TransFectinTM. Bezprostředně po lipofekční reakci byly přeneseny na podpůrnou vyživovací vrstvu pre-Sertoliho buněk a kultivovány po dobu 1,5 měsíce. Pozitivní výsledek transfekce ukazuje obr. 24, kde jsou zřejmé narostlé kolonie zárodečných kmenových buněk exprimující GFP.



Obr. 24. Transfekce zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* (zvětšeno 200x).

- A) Kolonie zárodečných kmenových buněk po lipofekci pomocí TransFectinTM. Transfekovány byly jednotlivé zárodečné kmenové buňky vytříděné metodou FACS.
- B) Exprese GFP v kolonii zárodečných kmenových buněk po lipofekci.

6 DISKUSE

Kultivace kmenových buněk je druhově specifická. Tento fakt dokazují rozdílné kultivační podmínky myších a lidských embryonálních kmenových buněk (ESCs). Myší ESCs udržuje v nediferencovaném stavu kultivační médium s přidavkem LIF, avšak pro lidské ESCs je tento faktor nedostačující. Kultivační médium je nutné obohatit o FGF, popřípadě o další růstové faktory jako GNDF (glial cell line-derived neurotrophic factor), TGF- β (transforming growth factor- β) nebo KGF (keratinocyte growth factor) (Skottman and Hovatta, 2006). Ani u savců není známo, které růstové faktory se v přirozených podmínkách účastní proliferace a diferenciace kmenových buněk. U *X. tropicalis* bylo v nepublikovaných výsledcích naší laboratoře dokázáno, že pre-Sertoliho buňky v kultuře exprimují velké množství růstových faktorů, které jsou nezbytné pro kultivaci zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis*. Zatím není známo, které z těchto faktorů způsobují proliferaci zárodečných kmenových buněk v nediferencovaném stavu, a ke sledování jejich vlivů by bylo nutno příslušné faktory nejdříve připravit jako rekombinantní proteiny. Z toho vyplývá, že v současné době je základním předpokladem úspěšné kultivace kolonií podpurná vyživovací vrstva pre-Sertoliho buněk. Tento fakt dokazují i neúspěšné pokusy kultivace zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* na vrstvě embryonálních buněk *X. laevis*.

Pro studium zárodečných kmenových buněk je nutné manipulovat s čistou kulturou, proto i jedním z hlavních cílů této diplomové práce bylo jejich oddělení od pre-Sertoliho buněk. Jedna z možností vedoucí k separaci těchto dvou buněčných typů byla příprava TK⁻ linie pre-Sertoliho buněk. Tyto buňky nemají funkční enzym thymidin kinázu, která se uplatňuje při syntéze DNA přes prekurzory nukleotidů. V případě úspěšného založení dlouhodobě rostoucí TK⁻ linie pre-Sertoliho buněk, by byly tyto buňky použity jako

podpůrná vyživovací vrstva pro zárodečné kmenové buňky s možností jejího odstranění selekčním médiem HAT. I přesto, že byly buňky získány, v kultuře rostly velmi zvolna a po čase došlo k úplnému zastavení proliferace. Soudíme, že nedošlo k imortalizaci buněk, ale pouze k mutaci ve zmiňovaném genu. Možné vysvětlení zastavení proliferace poskytuje tzv. Hayflickův limit, který udává konečný počet dělení specifický pro daný buněčný typ (Hayflick and Moorhead, 1961). Připravené TK⁻ buňky byly zároveň velmi citlivé k účinkům roztoku trypsin-EDTA a i po použití výrazně ředěného roztoku došlo k poškození membránových proteinů a buňky již nebyly schopny přisednout ke kultivačnímu povrchu.

Jako další způsob separace kolonií zárodečných kmenových buněk od pre-Sertoliho buněk byl vyzkoušen mechanický přístup. Kolonie byly odděleny a přeneseny do čisté kultivační nádoby s kondicionovaným médiem. Již druhý den se v jejich bezprostřední blízkosti nacházely pre-Sertoliho buňky, které zřejmě migrovaly z kolonie. Po detailnějším zkoumání přenášených kolonií byly na jejich okraji pozorovány větší zakulacené buňky silně spojené s kolonií, které nebylo možno oddělit ani opakovaným protahováním kolonie přes pipetu. Na základě tohoto pokusu jsme předpokládali, že kolonie zárodečných kmenových buněk jsou lemovány pre-Sertoliho buňkami, které proliferují a vytváří tak novou podpůrnou vyživovací vrstvu. Tento předpoklad byl potvrzen vizualizací struktury kolonií na transmisním elektronovém mikroskopu. Jak bylo ukázáno, pre-Sertoliho buňky se nacházejí ve 2 - 3 vrstvách na okraji, ale jejich výskyt byl potvrzen i uvnitř kolonie. Toto uspořádání odpovídá struktuře semenotvorných kanálků ve varlatech samců *X. tropicalis*, kde jsou Sertoliho buňky po obvodu kanálku a směrem do středu jejich počet prudce klesá. Zároveň TEM vyvrátila naši hypotézu o těsném spojení buněk v koloniích a malém množství extracelulární matrix. Buňky uvnitř kolonie jsou většinou uspořádány jednotlivě a obklopuje je výrazná masa extracelulární matrix. Z těchto výsledků vyplývá, že zárodečné kmenové buňky a pre-Sertoliho buňky kultury *X. tropicalis* je

možné od sebe oddělit pouze disociací na jednobuněčnou suspenzi, kterou bude možno třdit pomocí FACS na základě velikosti.

Disociace kolonií lidských embryonálních kmenových buněk byla v počátečních studiích prováděna mechanicky. Nedocházelo však k rozpadu na jednotlivé buňky, ale vznikaly celé shluky (Thomson *et al.*, 1998). Použitím trypsinu bylo docíleno ještě menších shluků, ale schopnost přisednutí ke kultivačnímu povrchu byla velmi nízká (< 3%) (Hasegawa *et al.*, 2006). Mírnější dopady na životaschopnost buněk byl pozorován u použití enzymu kolagenáza IV štěpící síť extracelulární matrix. Nejlepší výsledky v dezintegraci kolonií lidských ESCs vykazuje směs enzymů AccutaseTM. Již po 10 min působení na kolonie byla získána jednobuněčná suspenze a další nespornou výhodou této směsi bylo udržení lidských ESCs v nediferencovaném stavu (Bajpai *et al.*, 2008).

V této diplomové práci byla dezintegrace kolonií zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* zkoušena dvěma způsoby. Mechanické protahování kolonie přes pipetu nevedlo k žádnému výsledku, kolonie zůstávaly i nadále v neporušeném stavu. Během chemické disociace došlo k vyzkoušení hned několika dezintegračních látek. U většiny z nich byl efekt totožný – roztok trypsin-EDTA, 1M DTT, KIO₄ a 2% cystein způsobily zvednutí kolonie od kultivačního podkladu včetně vrstvy pre-Sertoliho buněk, ale k rozvolňování na shluky či jednotlivé buňky nedocházelo. Tento stejný účinek byl pozorován dokonce i u komerční směsi proteáz AccutaseTM užívané k disociaci lidských ESCs. Ani po hodinovém působení a důkladném protahování kolonie pipetou nebyla získána jednobuněčná suspenze. V laboratoři byla vyzkoušena i kolagenáza IV, ale ani tento enzym nepodal jiný výsledek. Většího úspěchu bylo dosaženo působením Biotase, enzymatické směsi podobné k AccutaseTM, která oddělovala jednotlivé buňky z okrajů kolonií, avšak k jejich úplnému rozpadu opět nedošlo. Poslední testovanou disociační reagentem byl papain, který po 30 min inkubace s koloniemi

zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* způsobil jejich úplný rozpad (Obr. 17, 18).

Jediná úspěšná disociace kolonií byla pomocí papainu, která byla použita i před tříděním zárodečných kmenových buněk a pre-Sertoliho buněk na fluorescenčním průtokovém cytometru. Již po 20 min působení a důkladném protahováním kolonií přes pipetu docházelo k jejich celkovému rozpadu a vzniku jednobuněčné suspenze. Vzhledem k razantnosti působení papainu v čase byla kontrolována vitalita buněk po jeho působení pomocí barvení propidium jodidem. Tato látka je nepropustná pro buněčnou membránu živých buněk, ale proniká do neživých. Vzhledem k tomuto faktu se stává užitečným markerem životaschopnosti buněk při fluorescenční průtokové cytometrii, kde se odumřelé buňky nezahrnují do třídění a jsou považovány za odpad. Barvení propidium jodidem ukázalo, že buňky přežívají dezintegraci papainem s minimální ztrátou a jsou následně schopny dělení.

Metoda FACS nám umožnila z jednobuněčné smíšené suspenze vytřídit zárodečné kmenové buňky a získat tak jejich čistou suspenzi. Byly zvoleny dvě kontroly třídění. Smíšená buněčná populace z varlat *X. laevis* sloužila k porovnání a určení správného třídícího modu. Po vytřídění zárodečných kmenových buněk, jak z kultury *X. tropicalis*, tak i z varlat *X. laevis*, byl na těchto buňkách proveden test na přítomnost alkalické fosfatázy. Pozitivní výsledek tohoto testu potvrdil kmenovost vytříděných buněk, ale v budoucnosti bude nutné jej doplnit transfekcí zárodečných kmenových buněk GFP plasmidem a transplantací do varlat chemicky sterilizovaného samce *X. tropicalis*. Definitivním důkazem funkce kultivovaných buněk bude osídlení varlat a produkce spermií. Kolonizace semenotvorných kanálků zárodečnými kmenovými buňkami byla prvně prokázána u myši (Brinster and Zimmermann, 1994).

Optimalizace transfekce žabích buněk byla nejprve testována na pre-Sertoliho buňkách a ve většině případů byl používán plasmid pEGFP, který nese fluorescenční reportérový gen GFP. Byly vyzkoušeny dvě metody produkce transgenních buněk, elektroporace a lipofekce. I když je elektroporace úspěšně používána *in vivo* na pulce rodu *Xenopus* (Haas *et al.*, 2002), tak pro kulturu *X. tropicalis* se ukázala být zcela nevhodná. I přes použití široké škály elektroporačního napětí se nepodařilo najít jeho optimální hodnotu a transfekovat pre-Sertoliho buňky. Druhý používaný přístup je postaven na interakci mezi kationovým liposomem a záporně nabitou DNA. Bylo vyzkoušeno několik lipofekčních látek. Účinnost transfekce po použití FuGene[®], jetPEI[™], TurboFect[™] reagensií byla velmi nízká až nulová. Nejúčinnější se zdál být Lipofectamine[™]2000, ale po kultivaci buněk v selekčním médiu byla vitalita buněk výrazně nižší než u buněk, kde byl použit TransFectin[™]. Nízká účinnost spočívá v různém složení liposomů, které reagují s cytoplasmatickou membránou, na rozdíl od nízké životaschopnosti buněk po transfekci, která je dána různou toxicitou používaných lipofekčních látek.

K transfekci pre-Sertoliho buněk byl používán i plasmid pPNT, který nese geny pro dvojitou selekci, pozitivní i negativní. Tento systém byl určen k vytvoření transgenních pre-Sertoliho buněk, které by tvořily podklad pro kultivaci zárodečných kmenových buněk. Po nárůstu kolonií a negativní selekci podpůrné vyživovací vrstvy by došlo k vytvoření čisté kultury zárodečných kmenových buněk. Po vizualizaci struktury kolonií pomocí TEM a odhalení přítomnosti pre-Sertoliho buněk i uvnitř kolonií, se ukázal být tento systém nevhodný. Nejzásadnější problém, na který se při transfekci pre-Sertoliho buněk naráží je opět Hayflickův limit. Omezený počet buněčného dělení znemožňuje dlouhodobější kultivaci transgenních buněk. Pre-Sertoliho buňky proliferující zhruba 14 – 15 pasáží a poté kultura stagnuje. Z tohoto důvodu byla transfekována embryonální linie buněk *X. laevis*. Výsledek ukázal, že tyto buňky nejsou tak citlivé, a tím je i transfekce účinnější.

Zároveň jde o buňky bez Hayflickovy meze, tzn. s neomezeným počtem dělení. Přes veškeré snahy kultivovat na tomto podkladu kolonie zárodečných kmenových buněk *X. tropicalis* a to i s použitím kondicionovaného média z kultury pre-Sertoliho buněk, byly výsledky ko-kultivace neúspěšné. Další způsob, jak obejít Hayflickův limit pre-Sertoliho buněk, by bylo pomocí transfekce plasmidem obsahující gen pro telomerázu. Na přípravě tohoto plasmidu se v současné době pracuje.

Úspěšná optimalizace podmínek transfekce buněk *X. tropicalis* dovolila lipofekci zárodečných kmenových buněk s pozitivním výsledkem. Jednotlivé kmenové buňky, které byly vytrženy pomocí FACS, byly transfekovány plasmidem pEGFP a následně kultivovány na podpůrné vyživovací vrstvě pre-Sertoliho buněk. V současné době je nutné tyto kolonie znovu disociovat a získat tak klony jednotlivých buněk exprimujících GFP. V následujícím experimentu budou tyto GFP transgenní buňky transplantovány do varlat sterilizovaných samců a bude pozorováno jejich chování v semenotvorných kanálcích.

Vzhledem k tomu, že tato kultura zárodečných kmenových buněk *Xenopus tropicalis* je zatím ojedinělá, jedná se o průkopnické práce, které nemají hladký a jednosměrný průběh.

7 ZÁVĚR

- Byla připravena buněčná kultura *X. tropicalis* deficientní v genu pro thymidin kinázu.
- Výsledky transmisní elektronové mikroskopie dokázaly, že kolonie zárodečných kmenových buněk jsou smíšené s pre-Sertoliho buňkami a obsahují velké množství extracelulární matrix.
- Bylo ukázáno, že složení a uspořádání buněk v koloniích zárodečných kmenových buněk koresponduje se strukturou semenotvorného kanálku varlete *X. tropicalis*.
- Podařilo se optimalizovat disociaci kolonií zárodečných kmenových buněk a získat tak jednobuněčnou suspenzi pro další studie.
- Docílilo se oddělení pre-Sertoliho buněk a zárodečných kmenových buněk, čímž byla získána jejich čistá kultura.
- Zdařilo se najít vhodnou lipofekční látku, která úspěšně transfekuje žabí buňky.
- Byla připravena transgenní embryonální buněčná linie *X. laevis*, která stabilně exprimuje GFP.
- Podařilo se úspěšně transfekovat zárodečné kmenové buňky GFP plasmidem, což se v dalších studiích stane nástrojem pro potvrzení kmenovosti těchto buněk.

8 SEZNAM LITERATUREY

Aflatoonian,B. and Moore,H. (2005) Human primordial germ cells and embryonic germ cells, and their use in cell therapy. *Curr.Opin.Biotechnol.* **16**:530-535.

Akama,T.O., Nakagawa,H., Sugihara,K., Narisawa,S., Ohyama,C., Nishimura,S., O'Brien,D.A., Moremen,K.W., Millan,J.L., and Fukuda,M.N. (2002) Germ cell survival through carbohydrate-mediated interaction with Sertoli cells. *Science* **295**:124-127.

Amaya,E., Offield,M.F., and Grainger,R.M. (1998) Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends Genet.* **14**:253-255.

Bacchetti,S. and Graham,F.L. (1977) Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**:1590-1594.

Bajpai,R., Lesperance,J., Kim,M., and Terskikh,A.V. (2008) Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol.Reprod.Dev.* **75**:818-827.

Beck,C.W. and Slack,J.M. (2001) An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biol.* **2**:REVIEWS1029.

Bellerby,C.W. (1934) A rapid test for the diagnostic of pregnancy. *Nature* **133** :494-495.

Bisbee,C.A., Baker,M.A., Wilson,A.C., Haji-Azimi,I., and Fischberg,M. (1977) Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science* **195**:785-787.

Bortvin,A., Goodheart,M., Liao,M., and Page,D.C. (2004) Dppa3 / Pgc7 / stella is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *BMC Dev.Biol.* **4**:2.

Brinster,R.L. and Avarbock,M.R. (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**:11303-11307.

Brinster,R.L. and Zimmermann,J.W. (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:11298-11302.

Callery,E.M. (2006) There's more than one frog in the pond: a survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology. *Semin.Cell Dev.Biol.* **17**:80-92.

Cannatella,D.C. and de Sa,R.O. (1993) *Xenopus laevis* as a model organism. *Syst.Biol.* **42**:476-507.

Cannatella,D.C. and Trueb,L. (1988) Evolution of pipoid frogs: intergeneric relationships of the aquatic frog family Pipidae (Anura). *Zool.J.Linn.Soc.* **94**:1-38.

- Chae,J., Zimmerman,L.B., and Grainger,R.M.** (2002) Inducible control of tissue-specific transgene expression in *Xenopus tropicalis* transgenic lines. *Mech.Dev.* **117**:235-241.
- Chen,Y., Yee,D., Dains,K., Chatterjee,A., Cavalcoli,J., Schneider,E., Om,J., Woychik,R.P., and Magnuson,T.** (2000) Genotype-based screen for ENU-induced mutations in mouse embryonic stem cells. *Nat.Genet.* **24**:314-317.
- Davidson,R.L., Adelstein,S.J., and Oxman,M.N.** (1973) Herpes simplex virus as a source of thymidine kinase for thymidine kinase-deficient mouse cells: suppression and reactivation of the viral enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **70**:1912-1916.
- de Sa,R.O. and Hillis,D.M.** (1990) Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol.Biol.Evol.* **7**:365-376.
- Donovan,P.J. and de Miguel,M.P.** (2003) Turning germ cells into stem cells. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **13**:463-471.
- Evans,B.J., Kelley,D.B., Tinsley,R.C., Melnick,D.J., and Cannatella,D.C.** (2004) A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Mol.Phylogenet.Evol.* **33**:197-213.
- Forristall,C., Pondel,M., Chen,L., and King,M.L.** (1995) Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development* **121**:201-208.
- Gilbert,S.F.** (2006) *Developmental biology*. Sinauer Associates Inc.
- Goda,T., Abu-Daya,A., Carruthers,S., Clark,M.D., Stemple,D.L., and Zimmerman,L.B.** (2006) Genetic screens for mutations affecting development of *Xenopus tropicalis*. *PLoS.Genet.* **2**:e91.
- Graf,J.D.** (1989) Genetic mapping in *Xenopus laevis*: eight linkage groups established. *Genetics* **123**:389-398.
- Gurdon,J.B.** (1975) Attempts to analyse the biochemical basis of regional differences in animal eggs. *Ciba Found.Symp.* **0**:223-239.
- Gurdon,J.B. and Hopwood,N.** (2000) The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *Int.J.Dev.Biol.* **44**:43-50.
- Gurdon,J.B., Lane,C.D., Woodland,H.R., and Marbaix,G.** (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**:177-182.
- Haas,K., Jensen,K., Sin,W.C., Foa,L., and Cline,H.T.** (2002) Targeted electroporation in *Xenopus* tadpoles in vivo--from single cells to the entire brain. *Differentiation* **70**:148-154.

- Hahnel,A.C., Rappolee,D.A., Millan,J.L., Manes,T., Ziomek,C.A., Theodosiou,N.G., Werb,Z., Pedersen,R.A., and Schultz,G.A.** (1990) Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* **110**:555-564.
- Hasegawa,K., Fujioka,T., Nakamura,Y., Nakatsuji,N., and Suemori,H.** (2006) A method for the selection of human embryonic stem cell sublines with high replating efficiency after single-cell dissociation. *Stem Cells* **24**:2649-2660.
- Hayflick,L. and Moorhead,P.S.** (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.* **25**:585-621.
- Heasman,J.** (2002) Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev.Biol.* **243**:209-214.
- Heasman,J., Hynes,R.O., Swan,A.P., Thomas,V., and Wylie,C.C.** (1981) Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell* **27**:437-447.
- Heasman,J., Kofron,M., and Wylie,C.** (2000) Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev.Biol.* **222**:124-134.
- Heasman,J., Quarmby,J., and Wylie,C.C.** (1984) The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material. *Dev.Biol.* **105**:458-469.
- Heasman,J. and Wylie,C.C.** (1978) Electron microscopic studies on the structure of motile primordial germ cells of *Xenopus laevis* in vitro. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **46**:119-133.
- Hirsch,N., Zimmerman,L.B., and Grainger,R.M.** (2002a) *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Dev.Dyn.* **225**:422-433.
- Hirsch,N., Zimmerman,L.B., Gray,J., Chae,J., Curran,K.L., Fisher,M., Ogino,H., and Grainger,R.M.** (2002b) *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in the study of embryonic induction. *Dev.Dyn.* **225**:522-535.
- Houston,D.W. and King,M.L.** (2000) A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development* **127**:447-456.
- Ikenishi,K.** (1998) Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev.Growth Differ.* **40**:1-10.
- Ikenishi,K. and Kotani,M.** (1979) Ultraviolet effects on presumptive primordial germ cells (pPGCs) in *Xenopus laevis* after the cleavage stage. *Dev.Biol.* **69**:237-246.
- Josso,N.** (2008) Professor Alfred Jost: the builder of modern sex differentiation. *Sex Dev.* **2**:55-63.

Kamimura,M., Ikenishi,K., Kotani,M., and Matsuno,T. (1976) Observations on the migration and proliferation of gonocytes in *Xenopus laevis*. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **36**:197-207.

Kanatsu-Shinohara,M., Ogonuki,N., Inoue,K., Miki,H., Ogura,A., Toyokuni,S., and Shinohara,T. (2003) Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol.Reprod.* **69**:612-616.

Kenwrick,S., Amaya,E., and Papalopulu,N. (2004) Pilot morpholino screen in *Xenopus tropicalis* identifies a novel gene involved in head development. *Dev.Dyn.* **229**:289-299.

Khokha,M.K., Chung,C., Bustamante,E.L., Gaw,L.W., Trott,K.A., Yeh,J., Lim,N., Lin,J.C., Taverner,N., Amaya,E., Papalopulu,N., Smith,J.C., Zorn,A.M., Harland,R.M., and Grammer,T.C. (2002) Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development. *Dev.Dyn.* **225**:499-510.

King,T.J. and Briggs,R. (1955) Changes in the nuclei of differentiating gastrula cells, as demonstrated by nuclear transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **41**:321-325.

Klein,S.L., Strausberg,R.L., Wagner,L., Pontius,J., Clifton,S.W., and Richardson,P. (2002) Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev.Dyn.* **225**:384-391.

Kloc,M., Bilinski,S., Pui-Yee,C.A., and Etkin,L.D. (2000) The targeting of Xcat2 mRNA to the germinal granules depends on a cis-acting germinal granule localization element within the 3'UTR. *Dev.Biol.* **217**:221-229.

Kloc,M., Dougherty,M.T., Bilinski,S., Chan,A.P., Brey,E., King,M.L., Patrick,C.W., Jr., and Etkin,L.D. (2002) Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev.Biol.* **241**:79-93.

Kloc,M., Spohr,G., and Etkin,L.D. (1993) Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science* **262**:1712-1714.

Kobel,H.R. and Du Pasquier,L. (1986) Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends Genet.* **2**:310-315.

Konrad,L., Munir,K.M., Cordes,A., Volck-Badouin,E., Laible,L., Albrecht,M., Renneberg,H., and Aumuller,G. (2005) Rat Sertoli cells express epithelial but also mesenchymal genes after immortalization with SV40. *Biochim.Biophys.Acta* **1722**:6-14.

Kroll,K.L. and Amaya,E. (1996) Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122**:3173-3183.

Krylov,V., Tlapakova,T., and Macha,J. (2007) Localization of the single copy gene *Mdh2* on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenet.Genome Res.* **116**:110-112.

Ku,M. and Melton,D.A. (1993) Xwnt-11: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development* **119**:1161-1173.

Lawson,K.A., Dunn,N.R., Roelen,B.A., Zeinstra,L.M., Davis,A.M., Wright,C.V., Korving,J.P., and Hogan,B.L. (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* **13**:424-436.

Littlefield,J.W. (1965) Studies on thymidine kinase in cultured mouse fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta* **95**:14-22.

Lui,W.Y., Mruk,D., Lee,W.M., and Cheng,C.Y. (2003) Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol.Reprod.* **68**:1087-1097.

MacGregor,G.R., Zambrowicz,B.P., and Soriano,P. (1995) Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* **121**:1487-1496.

Marsh-Armstrong,N., Huang,H., Berry,D.L., and Brown,D.D. (1999) Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**:14389-14393.

Martin,G.R. and Evans,M.J. (1975) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **72**:1441-1445.

Matz,M.V., Fradkov,A.F., Labas,Y.A., Savitsky,A.P., Zarausky,A.G., Markelov,M.L., and Lukyanov,S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat.Biotechnol.* **17**:969-973.

McLaren,A. (1995) Germ cells and germ cell sex. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **350**:229-233.

McLaren,A. and Southee,D. (1997) Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev.Biol.* **187**:107-113.

Morrish,B.C. and Sinclair,A.H. (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* **124**:447-457.

Mosquera,L., Forristall,C., Zhou,Y., and King,M.L. (1993) A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. *Development* **117**:377-386.

Nishiumi,F., Komiya,T., and Ikenishi,K. (2005) The mode and molecular mechanisms of the migration of presumptive PGC in the endoderm cell mass of *Xenopus* embryos. *Dev.Growth Differ.* **47**:37-48.

Nutt,S.L., Bronchain,O.J., Hartley,K.O., and Amaya,E. (2001) Comparison of morpholino based translational inhibition during the development of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Genesis* **30**:110-113.

- Offield,M.F., Hirsch,N., and Grainger,R.M.** (2000) The development of *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. *Development* **127**:1789-1797.
- Pesce,M., Farrace,M.G., Piacentini,M., Dolci,S., and De Felici,M.** (1993) Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* **118**:1089-1094.
- Quaas,J. and Wylie,C.** (2002) Surface contraction waves (SCWs) in the *Xenopus* egg are required for the localization of the germ plasm and are dependent upon maternal stores of the kinesin-like protein Xklp1. *Dev.Biol.* **243**:272-280.
- Rana,A.A., Collart,C., Gilchrist,M.J., and Smith,J.C.** (2006) Defining synphenotype groups in *Xenopus tropicalis* by use of antisense morpholino oligonucleotides. *PLoS.Genet.* **2**:e193.
- Ressom,R.E. and Dixon,K.E.** (1988) Relocation and reorganization of germ plasm in *Xenopus* embryos after fertilization. *Development* **103**:507-518.
- Risley,M.S.** (1990) Support of *Xenopus laevis* spermatogenesis in vitro by different energy substrates. *Biol.Reprod.* **42**:511-522.
- Robb,D.L., Heasman,J., Raats,J., and Wylie,C.** (1996) A kinesin-like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus*. *Cell* **87**:823-831.
- Roe,B.A., Ma,D.P., Wilson,R.K., and Wong,J.F.** (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J.Biol.Chem.* **260**:9759-9774.
- Rossi,P., Sette,C., Dolci,S., and Geremia,R.** (2000) Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J.Endocrinol.Invest.* **23**:609-615.
- Saitou,M., Barton,S.C., and Surani,M.A.** (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* **418**:293-300.
- Savage,R.M. and Danilchik,M.V.** (1993) Dynamics of germ plasm localization and its inhibition by ultraviolet irradiation in early cleavage *Xenopus* embryos. *Dev.Biol.* **157**:371-382.
- Schmahl,J., Eicher,E.M., Washburn,L.L., and Capel,B.** (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* **127**:65-73.
- Schmid,M. and Steinlein,C.** (1991) Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **101**:123-132.
- Sekido,R., Bar,I., Narvaez,V., Penny,G., and Lovell-Badge,R.** (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev.Biol.* **274**:271-279.
- Sette,C., Dolci,S., Geremia,R., and Rossi,P.** (2000) The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int.J.Dev.Biol.* **44**:599-608.

- Shamblott,M.J., Axelman,J., Wang,S., Bugg,E.M., Littlefield,J.W., Donovan,P.J., Blumenthal,P.D., Huggins,G.R., and Gearhart,J.D.** (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**:13726-13731.
- Shapiro,H.A. and Zwarenstein,H.** (1934) A rapid test for pregnancy on *Xenopus laevis*. *Nature* **133**:762.
- Sinclair,A.H., Berta,P., Palmer,M.S., Hawkins,J.R., Griffiths,B.L., Smith,M.J., Foster,J.W., Frischauf,A.M., Lovell-Badge,R., and Goodfellow,P.N.** (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**:240-244.
- Skottman,H. and Hovatta,O.** (2006) Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction* **132**:691-698.
- Sutton,K.A.** (2000) Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells. *Rev.Reprod.* **5**:93-98.
- Thiebaud,C.H. and Fischberg,M.** (1977) DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **59**:253-257.
- Thomson,J.A., Itskovitz-Eldor,J., Shapiro,S.S., Waknitz,M.A., Swiergiel,J.J., Marshall,V.S., and Jones,J.M.** (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-1147.
- Tlapakova,T., Krylov,V., and Macha,J.** (2005) Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes. *Chromosome Res.* **13**:699-706.
- Tran,D. and Josso,N.** (1982) Localization of anti-Mullerian hormone in the rough endoplasmic reticulum of the developing bovine sertoli cell using immunocytochemistry with a monoclonal antibody. *Endocrinology* **111**:1562-1567.
- Tymowska,J.** (1973) Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, Pipidae. *Cytogenet.Cell Genet.* **12**:297-304.
- Tymowska,J. and Fischberg,M.** (1973) Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **44**:335-342.
- Wakahara,M.** (1996) Primordial germ cell development: is the urodele pattern closer to mammals than to anurans? *Int.J.Dev.Biol.* **40**:653-659.
- Weeks,D.L. and Melton,D.A.** (1987) A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell* **51**:861-867.
- Werdien,D., Peiler,G., and Ryffel,G.U.** (2001) FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res.* **29**:E53.

Whittington,P.M. and Dixon,K.E. (1975) Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **33**:57-74.

Ying,Y., Liu,X.M., Marble,A., Lawson,K.A., and Zhao,G.Q. (2000) Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol.Endocrinol.* **14**:1053-1063.

Zhou,Y. and King,M.L. (1996) Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* **122**:2947-2953.

9 PŘÍLOHY

Poster:

Tereza Tlapáková, Jaroslav Mácha, Vladimír Krylov, Jana Ševčíková
Jonáková, Nataša Šebková, **Monika Šídová**, Paul Richardson

Xenopus tropicalis pre-Sertoli cells support growth of germinal stem cells with
cocktail of growth factors.

12th International *Xenopus* Conference (8.-12.9.2008), Leiwen/Trier/Mosel,
Německo.

[illegible]